

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Fisiologia

**EFEITOS DA DIETA HIPERCALÓRICA E
DO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO NA GERAÇÃO DE
GLICEROL-3-FOSFATO NOS TECIDOS ADIPOSOS
BRANCO E MARROM DE RATOS**

Valéria Ernestânia Chaves
Prof. Dr. Renato Hélios Migliorini

Ribeirão Preto

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

University of São Paulo
School of Medicine of Ribeirão Preto
Department of Physiology

**EFFECTS OF HYPERCALORIC DIET AND SYMPATHETIC NERVOUS
SYSTEM ON GLYCEROL-3-PHOSPHATE GENERATION IN
WHITE AND BROWN ADIPOSE TISSUE OF RATS**

Valéria Ernestânia Chaves
Prof. Dr. Renato Hélios Migliorini

Ribeirão Preto
2008

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Fisiologia

**EFEITOS DA DIETA HIPERCALÓRICA E
DO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO NA GERAÇÃO DE
GLICEROL-3-FOSFATO NOS TECIDOS ADIPOSOS
BRANCO E MARROM DE RATOS**

Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Fisiologia.

Valéria Ernestânia Chaves
Prof. Dr. Renato Hélios Migliorini

Ribeirão Preto
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Chaves, Valéria Ernestânia

EFEITOS DA DIETA HIPERCALÓRICA E DO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO NA GERAÇÃO DE GLICEROL-3-FOSFATO NOS TECIDOS ADIPOSOS BRANCO E MARROM DE RATOS. Ribeirão Preto, 2008.

140 p. 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Departamento de Fisiologia, Programa: Fisiologia.

Orientador: Migliorini, Renato Hélios.

1. Rato. 2. Tecido adiposo 3. Glicerol-3-fosfato 4. Dieta hipercalórica. 5. Sistema nervoso simpático.

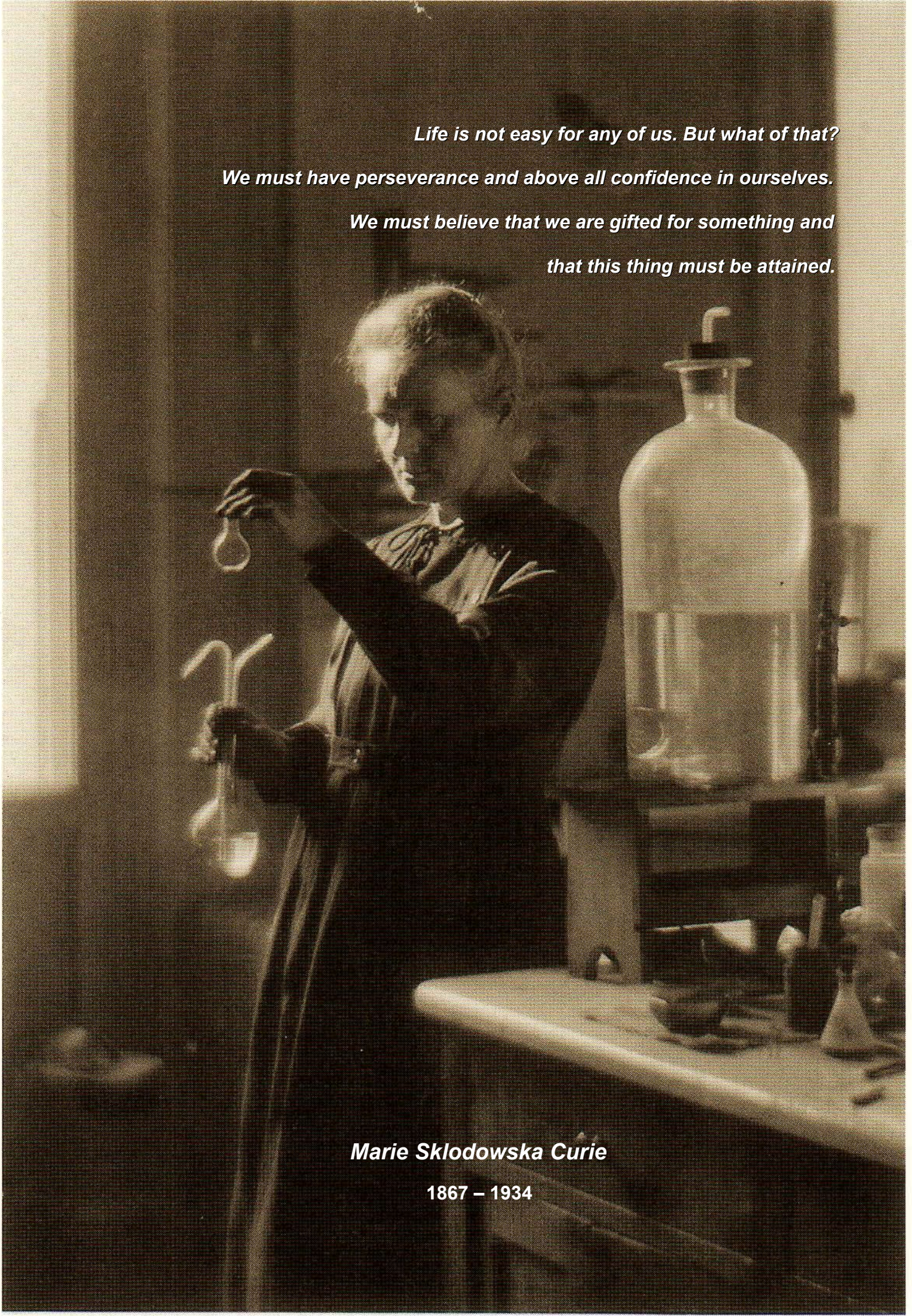
Ao **Dr. Renato Hélios Migliorini**,
com admiração, respeito e gradidão,
pelo exemplo de Professor e Cientista.

Ao meu pai **José Moreira Chaves**,
à minha mãe **Maria Iranilda Chaves**,
aos meus irmãos **Dálcio e Diogo**,
à **Vovó Tina** e aos meus Padrinhos **Jaci e Aidê**,
pelo Amor e exemplo de Coragem e Fé.

*Life is not easy for any of us. But what of that?
We must have perseverance and above all confidence in ourselves.
We must believe that we are gifted for something and
that this thing must be attained.*

Marie Skłodowska Curie

1867 – 1934



Agradeço ao Pai-Mãe Supremo e aos seus filhos....

Dra. Isis do Carmo Kettelhut, pela orientação, pelos inúmeros ensinamentos e pelos valiosos conselhos, norteadores de importantes decisões; pelas palavras de ânimo e coragem, pelo exemplo de vida e admirável força.

Dr. Claude Forest, pela oportunidade de estágio em seu laboratório, pelo respeito, incentivo e ensinamentos.

Maria Antonieta Rissato Garófalo, pela amizade e pelo apoio técnico de extrema qualidade, pela paciência e disponibilidade em ensinar-me como conduzir as práticas científicas, pela sua alegria e entusiasmo.

Danúbia Frasson e Maria Emília Soares Martins dos Santos, pela amizade, cumplicidade, companheirismo, apoio, sugestões, conselhos, confidências, sinceras conversas, incansável ajuda e por todo o empenho em criar uma fraterna irmandade gliceroneogênica.

Neusa Maria Zanon, pelos saudáveis conselhos e exemplo de determinação, pela amizade e apoio técnico. **Elza Aparecida Filippin**, pela amizade, sinceridade e apoio técnico. **Victor Diaz Galban**, pela pronta disponibilidade em ajudar-me nas questões computacionais e pelos sinceros conselhos. **Luiz Carlos Carvalho Navegantes**, pela amizade, conselhos e disponibilidade. **Andreza Bonifácio e Adriano Duran**, pela agradável convivência.

Sílvia de Paula Gomes, Luciana Carvalho, Eduardo Carvalho Lira, Dawit Albieiro Pinheiro Gonçalves, Thiago de Lorena Fábio, pela amizade e pela convivência alegre, agradável e harmoniosa, transformando o Laboratório de Controle do Metabolismo em um ambiente familiar.

Amanda Martins Baviera, pelas conversas, pelo apoio, pela grande amizade e pela capacidade de revigorar as minhas forças em busca dos meus sonhos e ideais. **Walter Dias Júnior e Loislene Oliveira Brito**, por terem despertado a minha atenção para a natureza e para a arte, pela troca de experiências, sinceridade e apoio. **Lidiany Góis**, pela pronta disponibilidade em ouvir várias vezes as mesmas histórias e questionamentos, pelos sinceros conselhos e pelo respeito.

Dr. Ithamar Vugman, pela sincera amizade, por compartilhar comigo as suas experiências, apoiar os meus ideais, me transmitir coragem e por sempre nos dar uma dica de uma forma mais alegre e leve de encarar a vida. **Zeni Martins**, pela amizade, pelos sábios conselhos e saborosos jantares.

Elísio Alberto Evangelista e Raquel do Pilar Machado, por terem despertado o meu interesse pelo estudo da química fisiológica, pelo exemplo de humildade e generosidade, pelos conselhos e amizade. **Renata Nascimento de Freitas**, pela oportunidade de iniciar a pesquisa científica, pela amizade e paciência.

Dr. Eduardo Brandt Oliveira, por ter me demonstrado a possibilidade de criação dos circuitos eletrônicos, pelos ensinamentos bioquímicos e pelo exemplo de um professor empenhado em estimular o raciocínio em seus alunos.

Renata Guerra de Sá, por ter me acolhido e protegido com afeto, me escolhido como confidente de histórias intermináveis e me presenteado com a mobília de sua casa, quando decidiu se mudar para outra cidade. **William Tadeu Lara Festuccia** e **Maria Ida Bonini Ravanelli**, pelos conselhos e exemplo de determinação. **Renata Polessi Boschini**, pela sinceridade e pelo exemplo de coragem e maturidade, demonstrando a necessidade de mudarmos de direção se intimamente sentimos que não acertamos no caminho escolhido.

Érica Granjeiro, Leandro Marques, Domitila Huber, Josiane Campos, Julianna Borges, Karin Weissheimer, Luciana Oliveira, Angelita Stábile e **Viviana Moreto**, pelo companheirismo e desprendimento durante os cursos de fisiologia. **William Borges**, pela ajuda indispensável nos experimentos de *Western Blot*. **Ruither Carolino** e **Fernanda Cabral**, pela amizade e pelos sinceros conselhos. **Rosana, Felipe, Sami, Nayara** e **Larissa**, pela pronta disponibilidade em ajudar e por tornarem o corredor da bioquímica muito mais alegre.

Vanessa e **Maria José**, pelo incentivo constante, acreditando e torcendo por mim. **Mailza**, pelos ensinamentos e orações diárias. **Amigos Belmont**, por me ajudarem constantemente, por me transmitirem ânimo, entusiasmo e alegria. **Carmem, Maria e Jorge**, pelas sinceras conversas.

Gercinair Silvério, por ter se interessado pelos meus dons e se empenhado em me conscientizar da importância deles. **Graziela Valadares**, pelo desprendimento, alegria, confiança e por me transmitir o sentimento de um ser sempre espiritualmente protegido. **Françoise Fouque**, pelos ensinamentos e pela proteção afetuosa. **Martine Collinet**, pelos sinceros e inesquecíveis conselhos. **Nadia Mehebik**, pela confiança e amizade. **Irene Altafin, Karina Toledo, Daniela Marzola** e **Valéria Cristina**, pela confiança, sinceros conselhos, incentivo e bons momentos. **Alzenny, Genylton, Arthur** e **Maria Helena, Ricardo, Priscilla, Oliver, Carlinda** e **Peri**, por todo aprendizado compartilhamento, pela alegria e pelos jantares capazes de transmutar toda e qualquer tristeza.

Cláudia, Elisa, Fernando e **Carlos; Ivone, Lúcia, Téia** e **Ronaldo**, funcionários dos departamentos de Fisiologia e Bioquímica & Imunologia, o meu muito obrigada pela competência e dedicação de vocês.

... pelo Amor, Vida, Força, Luz e Oportunidade de Evolução.

*Quando amanheceu veio o vento e arrancou a folha do seu galho.
Não doeu. Ela sentiu que flutuava no ar, muito serena. E, enquanto caía,
ela viu a árvore inteira pela primeira vez. Como era forte e firme!
Teve certeza de que a árvore viveria por muito tempo, compreendeu
que fora parte de sua vida e isto deixou-a orgulhosa.
A folha pousou num monte de neve.
Estava macio, até mesmo aconchegante.
Naquela posição, a folha estava mais confortável
do que jamais se sentira. Ela fechou os olhos e adormeceu.
Não sabia que a primavera se seguiria ao inverno, que a neve derreteria
e viraria água. Não sabia que a folha que fora,
seca e aparentemente inútil, se juntaria com a água e
serviria para tornar a árvore mais forte.
E, principalmente, não sabia que ali, na árvore e no solo,
já havia planos para novas folhas na primavera.*

A História de uma Folha

Leo Buscaglia

Índice

Resumo	<i>i</i>
Summary	<i>iii</i>
I. Introdução	
1.1 Tecido Adiposo Branco.....	1
1.2 Tecido Adiposo Marrom.....	12
II. Objetivos	21
III. Material e Métodos	
3.1 Animais e seu tratamento	
3.1.1 Dieta hipercalórica.....	23
3.1.2 Técnica de desnervação unilateral do tecido adiposo marrom	
3.1.3 Técnica de desnervação unilateral do tecido adiposo branco	
3.2 Determinação do conteúdo de ácidos graxos totais da carcaça	26
3.3 Determinação do conteúdo lipídico do TAMI e do fígado.....	26
glicose, triacilgliceróis e ácidos graxos livres.....	
3.5 Velocidade de renovação de noradrenalina.....	27
3.6 Isolamento das mitocôndrias do TAMI.....	29
3.6.1 Ligação mitocondrial de GDP.....	29
3.6.2 Conteúdo da UCP-1.....	30
3.7 Síntese de ácido graxo <i>in vivo</i>	33
3.8 Índice de captação de glicose <i>in vivo</i>	34
triacilglicerol (TAG)	
3.9.1 Fragmentos do TAMI.....	36
3.9.2 Adipócitos isolados do TAB.....	36
3.10 Extração dos lipídios totais	37
3.11 Medida das atividades enzimáticas	
3.11.1 Fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK).....	38
3.11.2 Gliceroquinase (GK).....	39

3.11.3 Lipase lipoprotéica (LPL).....	40
3.12. Tratamento estatístico dos resultados	42
IV. Resultados	
4.1 Ingestão calórica dos animais.....	43
4.2 Ganho de peso dos animais.....	43
4.3 Distribuição calórica da dieta ingerida pelos animais	46
4.4 Níveis plasmáticos de glicose, insulina, triacilglicerol, ácidos graxos livres e proteínas totais.....	48
4.5 Conteúdo de ácido graxo total da carcaça e de lipídios totais hepático.....	48
4.6 Peso de diferentes depósitos do TAB.....	48
4.7 Tecido Adiposo Branco (TAB)	
4.7.1 Velocidade de renovação de noradrenalina.....	53
4.7.2 Avaliação da via glicolítica	
4.7.2.1 Índice de captação de glicose.....	56
4.7.3 Avaliação da via gliceroneogênica	
4.7.3.1 Incorporação de 1- ¹⁴ C piruvato em glicerol de TAG.....	59
4.7.3.2 Atividade da PEPCK.....	61
4.7.4 Avaliação do processo de fosforilação direta do glicerol	
4.7.4.1 Velocidade de incorporação de glicerol-U- ¹⁴ C em glicerol de TAG.....	63
4.7.4.2 Atividade da GK.....	65
4.7.5 Síntese de ácido graxo <i>de novo</i>	67
4.7.6 Atividade da LPL.....	69
4.8 Efeito da desnervação simpática cirúrgica unilateral do TAB retroperitoneal	
4.8.1 Avaliação da via glicolítica	
4.8.1.1 Índice de captação de glicose <i>in vivo</i>	71
4.8.2 Avaliação da via gliceroneogênica	

4.8.2.1	Incorporação de 1- ¹⁴ C piruvato em glicerol de TAG.....	73
4.8.2.2	Atividade da PEPCK.....	75
4.8.3	Avaliação do processo de fosforilação direta do glicerol	
4.8.3.1	Atividade da GK.....	77
4.9	Tecido Adiposo Marrom Interescapular (TAMI)	
4.9.1	Peso e conteúdo de lipídios totais e de proteínas totais e mitocondriais do TAMI.....	79
4.9.2	Avaliação da capacidade termogênica	
4.9.2.1	Velocidade de renovação da noradrenalina.....	80
4.9.2.2	Ligação mitocondrial de GDP.....	83
4.9.2.3	Conteúdo de UCP-1.....	85
4.9.3	Avaliação da via glicolítica	
4.9.3.1	Índice de captação de glicose.....	87
4.9.4	Avaliação da via gliceroneogênica.....	
4.9.4.1	Incorporação de 1- ¹⁴ C piruvato em glicerol de TAG.....	90
4.9.4.2	Atividade da PEPCK.....	92
4.9.5	Processo de fosforilação direta do glicerol	
4.9.5.1	Incorporação de glicerol-U- ¹⁴ C em glicerol de TAG.....	94
4.9.5.2	Atividade da GK.....	96
4.9.6	Síntese de ácidos graxos <i>de novo</i>	98
4.9.7	Atividade da LPL.....	100
V.	Discussão	102
5.1	Tecido Adiposo Branco.....	105
5.2	Tecido Adiposo Marrom.....	113
VI.	Referências bibliográficas	120

Resumo

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito da dieta hipercalórica (do tipo cafeteria) na geração de glicerol-3-fosfato (G3P) pelos tecidos adiposos branco (TAB) e marrom (TAM) antes e após a desnervação simpática cirúrgica unilateral. As três vias metabólicas de geração de G3P foram investigadas: a) *via* glicolítica, estimada pela captação de glicose *in vivo*, b) *via* gliceroneogênica, avaliada pela incorporação de 1-¹⁴C-piruvato em glicerol-triacilglicerol (TAG) e pela atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK); e c) processo de fosforilação direta do glicerol, avaliado pela incorporação de glicerol-U-¹⁴C em glicerol-TAG e pela atividade da gliceroquinase (GK). Como controle dos ratos alimentados com a dieta cafeteria foram utilizados ratos alimentados com dieta balanceada comercial. Os dois grupos foram submetidos à desnervação cirúrgica unilateral do tecido adiposo marrom (TAM) e apenas o grupo cafeteria foi submetido à desnervação do tecido adiposo branco (TAB) retroperitoneal. Os tecidos contralaterais intactos foram utilizados como controle.

A administração da dieta cafeteria durante três semanas induziu um aumento acentuado nos níveis plasmáticos de insulina e triacilglicerol (TAG), no conteúdo de ácido graxo total da carcaça, no peso de diferentes depósitos de TAB (epididimal, retroperitoneal, inguinal e mesentérico) e na capacidade termogênica do TAM, avaliada pela velocidade de renovação de noradrenalina, pela ligação de GDP e pelo conteúdo de UCP-1, sem, no entanto, alterar o ganho de peso corporal dos animais quando comparado aos controles.

Os resultados obtidos na avaliação das vias de geração de G3P mostram que, após três semanas, os ratos alimentados com a dieta cafeteria apresentam

uma maior velocidade de captação de glicose no TAM e no TAB (epididimal e retroperitoneal). Esses animais também apresentam um aumento na atividade da GK e na velocidade de incorporação de glicerol-U-¹⁴C em glicerol-TAG *in vitro* em ambos os tecidos. Em contraste aos efeitos na utilização de glicose, na atividade da GK e na síntese de glicerol-TAG de glicerol, a dieta cafeteria induziu uma redução acentuada na atividade da PEPCCK e na velocidade de incorporação de 1-¹⁴C-piruvato em glicerol-TAG em ambos TAM e TAB (epididimal e retroperitoneal). A desnervação do TAM e TAB retroperitoneal promoveu uma redução significativa (50%) na atividade da GK, mas não afetou a captação de glicose e a gliceroneogênese, avaliada pela atividade da enzima chave e pelo fluxo da via.

Nossos resultados demonstram que a gliceroneogênese pode ser inibida para ajustar o suprimento de G3P em situações em que a produção deste metabólito por outras vias (glicolítica e gliceroquinase) encontra-se aumentada. Este achado suporta a hipótese que a atividade das vias geradoras de G3P são reguladas para manter o suprimento adequado de G3P necessário para a esterificação e armazenamento de TAG. Os resultados obtidos com a desnervação do tecido adiposo, especialmente do TAM (um tecido ricamente inervado), permitem-nos sugerir a existência de uma regulação reciprocamente coordenada entre as vias glicolítica e gliceroneogênica, independente do processo de fosforilação direta do glicerol pela gliceroquinase, garantindo o fornecimento de G3P necessário para a esterificação dos ácidos graxos e armazenamento do TAG.

Summary

Summary

The purpose of the present work was to verify the effect of hypercaloric diet (type cafeteria) on glycerol-3-phosphate (G3P) generation in white and brown adipose tissue before and after unilateral surgical denervation. We examined the three pathways of G3P generation: a) by glycolysis, evaluated by *in vivo* glucose uptake, b) by glyceroneogenesis, evaluated by incorporation of 1-¹⁴C pyruvate into glycerol-triacylglycerol (TAG) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) activity, and c) by direct phosphorylation of glycerol, evaluated by incorporation of glycerol-U-¹⁴C into glycerol-TAG and glycerokinase (GK) activity. Rats fed a commercial balanced diet were used as control of cafeteria diet-fed rats. Both groups were submitted to a surgical unilateral sympathetic denervation of the brown adipose tissue (BAT) and only the cafeteria group was submitted to a surgical unilateral denervation of the retroperitoneal adipose tissue (RWAT). The contralaterals intact tissues were used as controls.

Feeding rats a cafeteria diet by 3 weeks induced an increase in the plasma insulin and TAG levels, in the carcass fatty acid content, in the weight of 4 different adipose tissue depots (epididymal, retroperitoneal, inguinal and mesenteric) and in the BAT thermogenic capacity, evaluated by norepinephrine turnover, GDP binding and UCP-1 content, but did not affect the weight body gain.

The results of the experiments on G3P generation pathways show that, after 3 weeks, rats fed the cafeteria diet had faster rates of *in vivo* glucose uptake in both BAT and white adipose tissue [WAT(retroperitoneal and epididymal)]. They also had greater GK activity and capacity to synthesize TAG-glycerol *in vitro* in both adipose tissues. In contrast to its effects on the uptake of glucose, GK, and TAG-glycerol

synthesis from glycerol, the cafeteria diet induced a marked reduction in the activity of PEPCK and the synthesis of TAG-glycerol from pyruvate *in vitro* by both BAT and WAT (retroperitoneal and epididymal). Denervation of BAT and retroperitoneal WAT from cafeteria diet-fed rats resulted in a significant (50%) reduction in the activity of glycerokinase, but it did not affect the rates of *in vivo* glucose uptake. Also, neither the activity of PEPCK nor the rates of incorporation of ¹⁴C-pyruvate into TAG-glycerol were significantly affected by denervation.

The results demonstrate that the glyceroneogenesis can be inhibited to adjust the supply of G3P in a situation in which the production of this metabolite by other pathways (glycolytic and glycerokinase) is activated. This finding supports the hypothesis that the activities of the G3P generation pathways are regulated to maintain an adequate supply of the G3P needed for fatty acid esterification and storage of TAG. Neither the uptake of glucose nor the glyceroneogenic activity of BAT and retroperitoneal WAT were affected by the marked reduction in GK activity induced by denervation of the tissue. It would thus appear that, in both tissue, the generation of G3P needed for TAG synthesis in each condition is solely controlled by reciprocal changes in the generation of G3P from glucose *via* glycolysis and from glyceroneogenesis independently from the G3P produced by GK.

Introdução

1. Introdução

1.1 Tecido adiposo branco

A função principal e melhor estudada do tecido adiposo branco (TAB) é contribuir para o controle do metabolismo energético mobilizando ou estocando energia na forma de triacilglicerol (TAG), composto estruturalmente formado pela união de uma molécula de glicerol a três moléculas de ácidos graxos (AGs) por meio de ligações ésteres. Uma reserva adequada de TAG é necessária para o tecido adiposo exercer sua função de mobilizar AGs de acordo com a demanda energética dos outros tecidos. Para o TAB atender às necessidades energéticas dos tecidos periféricos nas diversas situações fisiológicas, os TAGs são continuamente hidrolisados. Essa lipólise ocorre em grau variável de acordo com a demanda, liberando os AGs que serão transportados na circulação (na forma livre, não esterificados) ligados à albumina, onde poderão ser captados e oxidados pelos tecidos.

Os ácidos graxos livres (AGL) e a glicose constituem os principais substratos utilizados pelos tecidos periféricos para a produção de energia. Tanto a produção hepática de glicose quanto sua utilização pelos tecidos são controladas. Os AGL, no entanto, parecem ser controlados apenas ao nível de produção, não sendo conhecido nenhum fator responsável pela regulação de sua utilização. Portanto, um aumento nos níveis de AGL, ocorre por um aumento da sua produção (mobilização de AGs decorrentes da hidrólise de TAG).

O conteúdo de TAG armazenado no TAB é dependente do balanço entre sua velocidade de síntese (lipogênese) e sua velocidade de degradação (lipólise). Em períodos de balanço energético negativo, como durante o jejum, a lipólise é estimulada com o objetivo de liberar AGs e glicerol que serão utilizados como fonte

de energia em diversos tecidos corporais como fígado, músculo esquelético e cardíaco. Em contraste, em períodos de balanço energético positivo, como por exemplo, após a ingestão alimentar, a lipogênese e o armazenamento de TAG no TAB estão estimulados.

O controle da lipólise no TAB é bastante complexo e envolve a interação de diversos fatores. As catecolaminas são as ativadoras primárias da mobilização de AGs do TAB induzida pelo jejum. A noradrenalina ao se ligar aos receptores β -adrenérgicos, os quais são acoplados às proteínas Gs na membrana plasmática dos adipócitos, transmitem o sinal estimulatório à enzima adenilato ciclase, a qual catalisa a conversão de ATP em AMPc (adenosina monofosfato cíclico). O AMPc gerado se liga à proteína quinase dependente de AMPc (PKA) e a ativa pela dissociação das subunidades regulatórias e catalíticas. Uma vez estimulada, a PKA fosforila a lipase hormônio sensível (LHS), induz sua ativação e, subsequentemente, sua translocação do citosol para o glóbulo de gordura desencadeando a hidrólise dos TAG estocados (Belfrage *et al.*, 1981; Holm 2003; Su *et al.*, 2003). Além da LHS, as perilipinas, proteínas que recobrem a superfície do glóbulo de lipídios protegendo-os da hidrólise, também são fosforiladas pela PKA durante o estímulo lipolítico. Estas proteínas, quando fosforiladas, sofrem modificação conformacional permitindo assim o acesso da LHS ao glóbulo de gordura (Clifford *et al.*, 2000; Sztalryd *et al.*, 2003).

Estudos realizados recentemente em camundongos com ausência do gene que codifica a LHS sugerem que outras lipases podem participar da mobilização de AGs do TAB. Tem sido demonstrado que o tratamento de adipócitos isolados destes animais com isoproterenol promove um aumento moderado na taxa lipolítica quando comparado à estimulação lipolítica induzida nos adipócitos dos animais controles

(Okazaki *et al.*, 2002). Além disto, os camundongos com ausência da LHS apresentam acúmulo de diacilglicerol (DAG) no TAB, sugerindo que a LHS é uma enzima limitante para a hidrólise apenas do DAG (Haemmerle *et al.*, 2002). De fato, experimentos realizados *in vitro* têm demonstrado que a LHS é mais ativa na hidrólise de DAG e ésteres de colesterol se comparado à hidrólise de TAG e monoacilglicerol (Kraemer *et al.*, 2002). A superexpressão da nova lipase recentemente descrita, denominada lipase do triacilglicerol do adipócito (ATGL, PNPLA2, iPLA2 ou TTS2.2), promove um aumento na quebra de TAG e liberação de AGs do TAB (Zimmermann *et al.*, 2004; Jaworski *et al.*, 2007).

Ao contrário das catecolaminas, a insulina inibe a mobilização de AGs do TAB. A regulação da lipólise pela insulina pode envolver dois mecanismos distintos, sendo um deles dependente e o outro independente de AMPc. A supressão da lipólise dependente de AMPc induzida pela insulina envolve a ativação da fosfodiesterase do AMPc do tipo 3B (Stralfors *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 2005; Langin 2006). Este processo se inicia pela ligação da insulina ao seu receptor tirosina quinase causando a autofosforilação deste e, subsequentemente, a fosforilação dos substratos do receptor de insulina, permitindo sua interação com a subunidade p85 da fosfatidil inositol 3'-quinase (PI3K). Em seguida, PI3K propicia a fosforilação e ativação da proteína quinase B / Akt (PKB/Akt) por meio da PDK. PKB/Akt, por sua vez, fosforila e ativa a fosfodiesterase 3B, enzima responsável pela degradação do AMPc no adipócito. A diminuição dos níveis de AMPc prejudica a ativação da PKA e, consequentemente, a fosforilação da LHS e perilipinas, bloqueando a mobilização de AGs do TAB. A regulação da lipólise independente de AMPc pela insulina envolve a estimulação da proteína fosfatase-1 pela fosforilação de sua subunidade regulatória. A proteína fosfatase-1 ativada rapidamente desfosforila e desativa a

LHS, causando uma queda na taxa lipolítica do tecido (Londos *et al.*, 1985; Olsson *et al.*, 1987; Ragolia *et al.*, 1998).

Apesar do papel do sistema nervoso simpático (SNS) no controle da lipólise ser mais amplamente conhecido, recentemente tem sido demonstrado sua participação na diferenciação e proliferação dos adipócitos. Tem sido verificado que após 7 dias de desnervação simpática unilateral do TAB retroperitoneal ocorre um aumento significativo no peso do tecido, no conteúdo de DNA e na expressão da A2COL6/pOb24, um marcador do primeiro estágio de diferenciação celular quando comparado ao lado intacto inervado. O aumento do período de pós-desnervação simpática do TAB retroperitoneal, de uma semana para um mês, promove um aumento significativo no número de células do lado desnervado em comparação ao lado intacto inervado (Cousin *et al.*, 1993). Um aumento significativo no número de células do TAB inguinal também foi observado 11 semanas após desnervação simpática cirúrgica deste tecido (Youngstrom *et al.*, 1998). Concordante com estes dados obtidos *in vivo*, foi verificado que a noradrenalina inibe a proliferação de pré-adipócitos *in vitro*, um efeito bloqueado pela adição do propranolol (Jones *et al.*, 1992). Desta forma, tem sido sugerida uma relação inversa entre a atividade simpática para um determinado depósito de TAB e a proliferação celular (Hausman *et al.*, 2001).

O aumento da atividade lipolítica do TAB combinado com a diminuição da lipogênese conduz à diminuição do conteúdo de TAG dos adipócitos durante o jejum. Após uma alimentação rica em carboidratos, a atividade lipogênica, tanto no TAB quanto no fígado, encontra-se estimulada, levando à elevação dos níveis plasmáticos de TAG. Embora os fatores nutricionais sejam a causa primária das alterações na taxa de lipogênese no TAB, eles controlam a síntese de AGs não

apenas diretamente, pelas alterações do fluxo de metabólitos, como também pela ativação da secreção de hormônios reguladores da síntese de AGs (Hillgartner *et al.*, 1995; Kersten 2001).

A insulina é, provavelmente, o mais importante fator hormonal envolvido na regulação da lipogênese. Os efeitos da insulina são iniciados pela ligação da insulina ao seu receptor na superfície celular, ativando a atividade tirosina quinase do receptor e iniciando a cascata de transdução do sinal, que culminará com a estimulação da lipogênese por mais de um mecanismo: a) aumento da captação de glicose pelos adipócitos *via* recrutamento dos transportadores de glicose (GLUT-4) para a membrana plasmática; b) ativação das enzimas glicolíticas e lipogênicas por modificação covalente e/ou estimulação da expressão gênica (Foretz *et al.*, 1999; Kersten 2001; Griffin *et al.*, 2004).

Durante o processo de lipogênese, além dos AGs sintetizados *de novo* a partir da glicose ou de outros compostos produtores de acetil-CoA (como, alguns aminoácidos), os AGs esterificados pelo tecido podem ser provenientes da hidrólise dos TAGs endógenos ou captados da circulação através da hidrólise pela lipase lipoprotéica (LPL) dos TAGs presentes nos quilomicrons provenientes da absorção intestinal e nas lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) secretadas pelo fígado.

Uma série de evidências indica que a atividade da LPL no TAB pode ser controlada pela insulina e pela noradrenalina. Ratos jejuados, diabéticos e expostos ao frio apresentam diminuição na atividade da LPL no TAB quando comparados aos controles (Hollenberg *et al.*, 1959; Radomski *et al.*, 1971; Raurama *et al.*, 1980). A administração de uma dieta rica em carboidratos ou a adição de sacarose (32%) na água ingerida pelos ratos induz uma elevação nos níveis plasmáticos de insulina e

um aumento significativo na atividade da LPL do TAB (Granneman et al., 1983; Erskine et al., 1994). A administração de insulina a animais expostos ao frio ou ao jejum, bem como a adição de insulina e glicose ao meio de incubação de fragmentos do TAB de ratos jejuados elevam a atividade da enzima LPL (Hollenberg et al., 1959; Radomski et al., 1971; Borensztajn et al., 1972; Goubern et al., 1981). Os efeitos estimulatórios da glicose e da insulina na atividade da LPL no TAB de ratos jejuados são completamente bloqueados *in vivo* ou *in vitro* pela adição de inibidores da síntese protéica, indicando que a manutenção da atividade da LPL elevada requer uma síntese protéica contínua (Wing et al., 1966; Schotz et al., 1965; Eagle et al., 1964; Bergö et al., 2002). Apesar dos baixos níveis plasmáticos de insulina em ratos expostos ao frio, alguns trabalhos indicam que o efeito da exposição ao frio é mediado em parte pelo SNS, resultando em diminuição na atividade da LPL no TAB (Radomski et al., 1971). De fato, a injeção de noradrenalina ou isoproterenol mimetiza o efeito *in vivo* da exposição ao frio e pode ser bloqueado por antagonistas β -adrenérgicos (Carneheim et al., 1984; Deshaies et al., 1993).

Experimentos realizados neste laboratório com a técnica de dupla marcação (administração simultânea de $^3\text{H}_2\text{O}$ e de glicose- $\text{U-}^{14}\text{C}$) indicam que os AGs provenientes da síntese *de novo* constituem a menor fração do total de AGs utilizados pelo TAB para a síntese de TAG. Estes experimentos demonstraram que, em ratos alimentados com a dieta balanceada, ~ 63% do glicerol total sintetizado no TAB é utilizado para a esterificação de AGs pré-formados (captados da circulação ou reciclados da hidrólise de TAG endógenos), sendo assim apenas ~ 37% do glicerol total sintetizado é utilizado para a esterificação de AGs sintetizados *de novo* (Botion et al., 1998).

No entanto, independente da origem dos AGs, o fornecimento de glicerol-3-fosfato (G3P) é essencial para o funcionamento adequado do TAB e formação de TAG. A via clássica de obtenção de G3P pelo TAB é a sua síntese a partir de carbonos de glicose, pela conversão de dihidroxicetona fosfato, um intermediário da via glicolítica, a G3P, uma reação catalisada pela enzima G3P desidrogenase. Além desta via, o TAB possui duas outras formas de obtenção de G3P: a) fosforilação direta do glicerol pela gliceroquinase (GK) e b) via gliceroneogênica que consiste na formação de G3P a partir de compostos não glicídicos, como aminoácidos, lactato e piruvato, envolvendo a carboxilação do piruvato a oxaloacetato, descarboxilação do oxaloacetato a fosfoenolpiruvato e a formação de G3P por uma reversão parcial da via glicolítica (Figura 1).

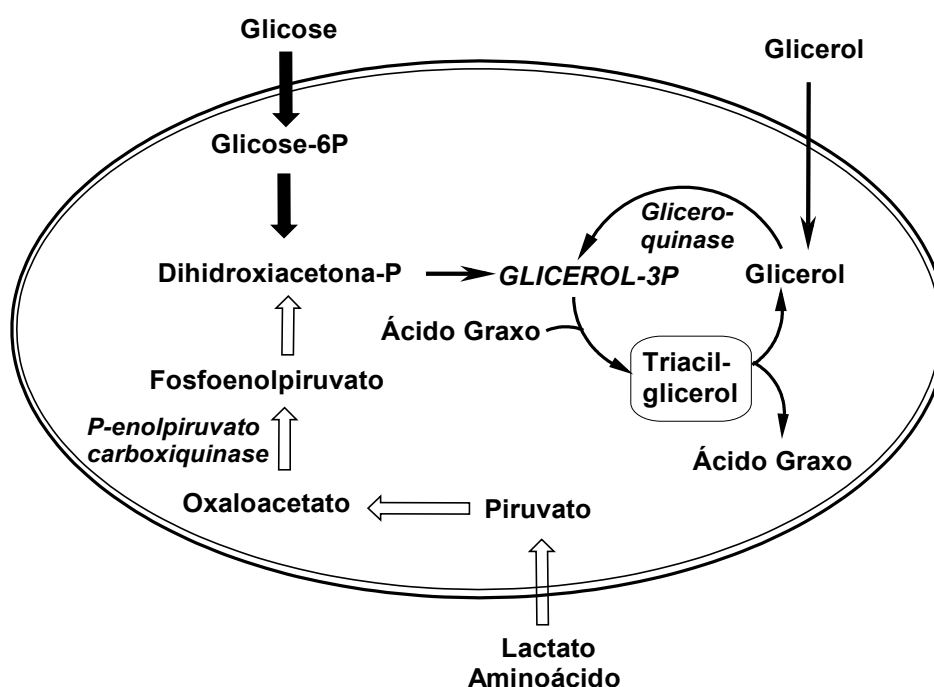


Figura 1: Fontes de glicerol-3-fosfato nos adipócitos branco e marrom.

O conteúdo e a atividade da GK no TAB são relativamente baixos e considerados desprezíveis quando comparados ao tecido adiposo marrom (TAM) ou

ao fígado. Esta informação tem permitido a utilização do glicerol liberado para o meio de incubação por fragmentos do TAB ou por adipócitos como índice da atividade lipolítica.

Em experimentos realizados *in vitro* foi verificado que o TAB é capaz de converter lactato, piruvato e aminoácidos glicogênicos em glicerol de TAG pela gliceroneogênese, sendo que a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) é a enzima chave desse processo (Ballard *et al.*, 1967; Gorin *et al.*, 1969; Reshef *et al.*, 1970; Hopgood *et al.*, 1973). Nesses estudos ainda foi observado que a atividade gliceroneogênica, estimada pela incorporação de piruvato em glicerol de TAG por fragmentos de tecido, encontrava-se aumentada no TAB de animais jejuados ou diabéticos (Ballard *et al.*, 1967; Gorin *et al.*, 1969). Como nessas duas situações a atividade lipolítica do TAB e os níveis de AG livres do plasma encontram-se aumentados, a ativação da gliceroneogênese foi originalmente interpretada como um mecanismo de restrição à lipólise, moderando a formação de corpos cetônicos e a acidose (Reshef *et al.*, 1970).

A primeira confirmação clara da importância metabólica dessa via foi obtida há alguns anos em estudos deste laboratório que demonstraram ser a gliceroneogênese, estimada *in vivo* em ratos não anestesiados alimentados com a dieta balanceada, uma das principais fontes de G3P tanto no TAB como no TAM e no fígado. A contribuição de carbonos glicídicos para síntese do glicerol total incorporado em TAG no TAB foi estimada em 44%, indicando uma participação importante (56%) da gliceroneogênese para a formação de G3P em animais alimentados com a dieta balanceada (Botion *et al.*, 1998). A presença da via gliceroneogênica no fígado foi, posteriormente, confirmada em estudos no homem (Kalhan *et al.*, 2001).

Experimentos em animais geneticamente modificados estabeleceram definitivamente a PEPCK como a enzima chave da gliceroneogênese no TAB. Camundongos com deleção gênica da PEPCK apresentam redução da gordura corporal e aumento da mobilização de AG do TAB (Olswang *et al.*, 2002). Por outro lado, camundongos transgênicos que produzem PEPCK em excesso são obesos e apresentam alta atividade gliceroneogênica no TAB e baixos níveis de AG livres plasmáticos (Franckhauser *et al.*, 2002). Mais recentemente foi demonstrado que a redução da mobilização de AGs produzida por tiazolidinedionas (TZD), drogas usadas no tratamento do diabetes, é devida principalmente à indução da transcrição do gene da PEPCK no TAB, com conseqüente aumento da gliceroneogênese e da esterificação de AGs (Tordjman *et al.*, 2003). Tais experimentos com animais geneticamente modificados ou que receberam TZD vieram comprovar a importância da gliceroneogênese e renovaram o interesse pelo esclarecimento de sua importância fisiológica.

O interesse do nosso laboratório no estudo da regulação da via gliceroneogênica iniciou-se com a observação de que ratos alimentados, por 30 dias, com a dieta hiperprotéica, livre de carboidratos (HP), apesar dos baixos níveis plasmáticos de insulina e altos de glucagon, mantinham consideráveis estoques de gordura corporal, representando 85-90% dos valores encontrados nos animais alimentados com a dieta balanceada. No entanto, estes animais apresentavam uma redução da capacidade lipogênica no TAB (epididimal, retroperitoneal, subcutâneo e intermuscular), no tecido hepático e na carcaça, avaliada *in vivo* com $^3\text{H}_2\text{O}$ (Schmid *et al.*, 1984; Botion *et al.*, 1992). Posteriormente, experimentos realizados *in vivo* pela administração simultânea de $^3\text{H}_2\text{O}$ e ^{14}C -glicose demonstraram um aumento na gliceroneogênese no TAB retroperitoneal e epididimal dos ratos adaptados à dieta

HP em relação aos animais controles, fornecendo o G3P necessário à manutenção das reservas lipídicas. Nestes mesmos experimentos foi verificado que a maioria do glicerol-TAG sintetizado pelo tecido é utilizado para esterificação de AGs pré-formados, que incluem os reciclados após a hidrólise dos estoques de TAG e aqueles provenientes da quebra do TAG presentes nas lipoproteínas circulantes (Botion *et al.*, 1998). Mais recentemente dados do nosso laboratório demonstraram a importância dos AGs provenientes da dieta no controle da gliceroneogênese no tecido adiposo (Brito *et al.*, 2006). O TAB retroperitoneal e epididimal de ratos adaptados à dieta HP apresentam um aumento na atividade da LPL, enzima que catalisa a hidrólise de TAG de quilomicrons e VLDL. Após administração de Triton WR 1339 (um inibidor da LPL e, portanto, bloqueador da captação de AGs das lipoproteínas da circulação) a estes animais, a atividade da gliceroneogênese, avaliada pela atividade da PECK e incorporação de 1-[¹⁴C] piruvato em glicerol-TAG, foi reduzida. Desta forma, a preservação da gordura corporal em ratos adaptados à dieta HP é mantida devido à uma maior eficiência do tecido adiposo destes animais em utilizar AGs da dieta (Brito *et al.*, 2006).

O TAB retroperitoneal e epididimal dos animais adaptados à dieta HP apresentam uma redução na velocidade de utilização de glicose, evidenciada pela diminuição da captação de glicose *in vivo* e diminuição do fluxo glicolítico (estimado pela 5-[³H] glicose) e da captação de glicose *in vitro* (estimados pela 2-desoxi-1-[³H] glicose) pelos adipócitos isolados, bem como uma pronunciada redução da atividade das enzimas chaves da via glicolítica: hexoquinase, fosfofruto-1-quinase e piruvato quinase (Brito *et al.*, 2001). Devido à reduzida geração de G3P pela via glicolítica e pelo processo de fosforilação direta do glicerol pela GK no TAB dos ratos alimentados com a dieta HP, o aumento na gliceroneogênese foi interpretado como

um mecanismo compensatório para garantir o suprimento adequado e contínuo de G3P necessário para o armazenamento de TAG pelo tecido.

A atividade lipolítica basal e estimulada no TAB epididimal de ratos adaptados à dieta HP, avaliada tanto pela liberação de glicerol quanto pela liberação de AGs ao meio de incubação, apresenta-se reduzida quando comparada a de animais controles (Kettelhut *et al.*, 1985). Mais recentemente foi demonstrado que o principal mecanismo responsável pela redução da atividade lipolítica tanto basal quanto estimulada com isoproterenol (agente lipolítico) no TAB de ratos adaptados à dieta HP parece ser uma menor capacidade de translocação da LHS para a gota de gordura, no processo intracelular de ativação da lipólise (Martins-Afféri *et al.*, 2004).

O achado de aumento na gliceroneogênese no TAB dos ratos adaptados à dieta HP apesar da reduzida atividade lipolítica do tecido forneceu uma indicação de que esta via de geração de G3P tem uma importância fisiológica que vai além da simples participação na regulação da mobilização de ácidos graxos, moderando a formação de corpos cetônicos e a acidose, como proposto inicialmente (Reshef *et al.*, 1970). Esta observação revigorou o interesse do nosso laboratório no esclarecimento da regulação desta via de geração de G3P e sua importância fisiológica. No presente trabalho, a importância da gliceroneogênese foi investigada em ratos alimentados com uma dieta hipercalórica do tipo cafeteria, uma situação fisiológica em que o armazenamento de TAG no TAB está marcadamente estimulado e a mobilização de AG pelo tecido encontra-se modificada. A produção de G3P pela via glicolítica e pelo processo de fosforilação direta do glicerol pela GK, assim como o fornecimento de AG pela síntese *de novo* e a atividade da lipase lipoprotéica foram também investigados.

1.2 Tecido adiposo marrom

Contrário à noção que apenas humanos recém-nascidos apresentam tecido adiposo marrom (TAM), sendo este rapidamente perdido nos primeiros anos de vida, estudos recentes indicam que o TAM está presente e ativo em humanos adultos. Os maiores depósitos de TAM detectados estão localizados no pescoço e na região supraclavicular. Depósitos menores estão presentes ao longo da coluna espinal, na área periaórtica e perirenal (Nedergaad *et al.*, 2007). O TAM, contudo, é mais amplamente estudado em pequenos roedores, estando distribuído em depósitos discretos localizados, principalmente, nas regiões cervical, axilar, periaórtica, perirenal e interescapular (Stock *et al.*, 1986; Himms-Hagen, 1984).

O TAM é composto por células endoteliais, intersticiais, pré-adipócitos e adipócitos maduros. Os adipócitos marrons maduros contêm pequenas e numerosas gotículas lipídicas, sendo classificados como multiloculares, e várias organelas destacando-se o grande número de mitocôndrias. Essas caracterizam o TAM como um tecido de elevada atividade metabólica, uma vez que possui na membrana interna mitocondrial uma proteína desacopladora, UCP-1, não presente em outros tecidos, responsável pela sua função termogênica básica. Esta proteína possui a característica de ser ativada por AGs e inibida por nucleotídeos purínicos di- ou trifosfato, aumentando ou diminuindo o acoplamento entre a síntese de ATP e a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, um processo fisiológico e reversível (Himms-Hagen, 1989, Nicholls *et al.*, 1984; Cannon *et al.*, 2004).

O TAM é um tecido ricamente vascularizado, incluindo anastomoses arteriovenosas, permitindo a oferta adequada de oxigênio e substratos ao tecido e o rápido transporte do calor produzido aos outros órgãos nas situações de alta atividade termogênica (Himms-Hagen, 1989; Cannon *et al.*, 2004). Os adipócitos

marrons, bem como as células vasculares, recebem uma rica inervação simpática direta. O TAM interescapular (TAMI), depósito mais estudado em ratos, é suprido por uma rede de nervos simpáticos, que fornecem cinco ramificações sem cruzamento para cada lobo. A presença de dois lobos simétricos, cada qual independentemente innervado, permite a realização da desnervação simpática cirúrgica unilateral do TAM e o estudo, em um mesmo animal, do tecido desnervado e innervado expostos a fatores circulantes idênticos, propiciando o esclarecimento simultâneo do controle neural e hormonal do metabolismo desse tecido (Foster, 1982; Himms-Hagen, 1989). A origem da inervação simpática é difusa, tendo sido verificado a existência de células neurais responsáveis pela inervação do TAM no gânglio cervical intermediário, no núcleo pálido/magno da rafe, na região parapiamidal do complexo olivar inferior, na região ventrolateral rostral do bulbo, no grupo celular noradrenérgico A5 e em várias áreas hipotalâmicas: núcleo paraventricular, núcleo arqueado, núcleo dorsomedial, área preóptica e hipotálamo lateral, no entanto poucas destas áreas têm sido examinadas fisiologicamente (Morrison, 2004).

Os impulsos aferentes relacionados ao controle da temperatura, do estado alimentar e do estado energético corpóreo são integrados no hipotálamo e impulsos eferentes são emitidos via fibras simpáticas que diretamente innervam o TAM (Cannon *et al.*, 1998). A função termogênica do TAM, bem como sua diferenciação, são induzidas sob condições fisiológicas associadas a um aumento da estimulação simpática, como durante exposição ao frio (*non-shivering thermogenesis*) e ingestão de uma dieta hipercalórica (*diet-induced thermogenesis*), contribuindo para uma resposta adaptativa que promove resistência ao frio e ao ganho excessivo de peso corpóreo, respectivamente (Himms-Hagen, 1984). A administração da dieta

hipercalórica do tipo cafeteria (24 dias) induz um aumento de 57 e 77% no gasto energético de ratos adultos (5 meses de idade) e jovens (5 semanas de idade), respectivamente. A dieta também promove um aumento no ganho de peso corporal de animais adultos, mas não em animais jovens. Entretanto, ambos os grupos apresentam aumento no conteúdo de gordura corporal (Rothwell *et al.*, 1982^c). Já durante a restrição calórica ou jejum, a diminuição da atividade simpática para o TAM induz atrofia deste tecido e diminuição da produção de calor (Rothwell *et al.*, 1979; Himms-Hagen, 1984; Hayashi *et al.*, 1993).

Em situações de alta atividade termogênica, a noradrenalina desempenha um papel primário no controle da termogênese do TAM. A seqüência de eventos entre a liberação de noradrenalina pelas terminações simpáticas e o aumento na termogênese inclui a interação da noradrenalina com os receptores β -adrenérgicos (principalmente a subclasse β -3), estimulação da atividade da adenilato ciclase, *via* proteína Gs, aumento na produção de AMPc e ativação da LHS pela PKA. Uma vez ativada a LHS promove aumento da hidrólise do TAG intracelular, fornecendo suprimento de AGs, os quais constituem o substrato básico para a produção de calor pelo tecido e são ativadores do desacoplamento da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias. Este mecanismo de condutância de prótons regulável, único no TAM, permite uma taxa máxima de transporte de elétrons, promovendo a produção de calor (Himms-Hagen, 1984; Palou *et al.*, 1998). O mecanismo exato pelo qual os AGs estimulam a termogênese ainda não está totalmente esclarecido. No primeiro modelo, os AGs funcionam como ativadores alostéricos da UCP-1. Já no segundo modelo, a UCP-1 age como transportadora de AGs para o espaço intermembrana mitocondrial, permitindo que estes se tornem protonados e retornem livremente à matriz mitocondrial. Desta forma, os prótons retornam à matriz sem serem utilizados

para a síntese de ATP e a energia é liberada na forma de calor (Cannon *et al.*, 1998; Jezek *et al.*, 1998; Garlid *et al.*, 2000).

Assim, durante o processo de ativação da termogênese no TAM, uma das etapas obrigatórias é a hidrólise dos TAGs armazenados no tecido para produção de AGs, sendo fundamental a manutenção de reservas adequadas de TAG para garantir o funcionamento normal do TAM.

O interesse do nosso laboratório pelo metabolismo lipídico do TAM teve início pela observação de que ratos Wistar alimentados por 20 dias com a dieta HP, isocalórica em relação à dieta balanceada controle, apresentam diminuição no peso do TAM e na concentração de lipídios totais do tecido, apesar de não apresentarem diferença na quantidade de alimento ingerido e no ganho de peso corporal (Kettelhut *et al.*, 1980; Brito *et al.*, 1992). A diminuição do peso do TAM dos animais adaptados à dieta HP foi associada à redução de sua capacidade funcional, avaliada pela ligação mitocondrial de GDP, atividade da citocromo oxidase, resposta termogênica à infusão de noradrenalina e velocidade de renovação de noradrenalina (Brito *et al.*, 1992, Brito *et al.*, 1998). O TAM destes animais também apresenta diminuição na lipogênese *in vivo*, avaliada tanto com $^3\text{H}_2\text{O}$ como com ^{14}C -glicose, e na atividade de várias enzimas lipogênicas: glicose-6-fosfato desidrogenase, málica, ATP-citrato liase e acetil-CoA carboxilase (Brito *et al.*, 1999).

Apesar da redução na atividade funcional do TAM induzida pela dieta HP, este tecido mantém sua capacidade de responder à estimulação prolongada do SNS (10 dias de exposição ao frio) e à normalização dos padrões hormonais pela substituição dessa dieta pela balanceada (por 12 e 24 horas). A exposição ao frio (4°C) por 10 dias dos ratos adaptados à dieta HP induz aumento no peso do TAM e na síntese *de novo* de AG *in vivo*. Estes aumentos, contudo, são maiores no grupo

de animais alimentados com a dieta balanceada. A exposição dos animais ao frio, também, estimula a atividade da enzima acetil-CoA carboxilase e do complexo piruvato desidrogenase em ambos os grupos (Moura *et al.*, 2001). Desta forma, o maior fluxo simpático para o TAM induz hiperplasia no tecido e estimula a lipogênese mesmo em um tecido com reduzida capacidade termogênica. Por outro lado, a desnervação unilateral simpática do TAM dos ratos adaptados à dieta HP, não intensifica a redução da síntese *de novo* de AG *in vivo* e da atividade das enzimas acetil-CoA carboxilase e ATP-citrato liase decorrente da dieta. Entretanto, em ratos alimentados com a dieta balanceada a desnervação unilateral simpática do TAM promove uma diminuição na síntese *de novo* de AG *in vivo* e na atividade da acetil-CoA carboxilase (Kawashita *et al.*, 2002^c). A substituição da dieta HP pela dieta balanceada, normalizando os níveis plasmáticos de insulina, restabelece completamente a síntese de AG e parcialmente as atividades enzimáticas no TAM; contudo, a desnervação simpática unilateral do TAM prejudica esta restauração. Além disso, o tratamento com soro anti-insulina durante 12 e 24 horas depois da reversão da dieta bloqueia totalmente a restauração da lipogênese do TAM tanto no lobo inervado quanto no desnervado (Kawashita *et al.*, 2002^c). Estes resultados demonstram que o TAM pode manter significativa taxa de lipogênese na ausência de ativação simpática, mas não na ausência de insulina.

A síntese e o armazenamento de TAG no TAM e, conseqüentemente o funcionamento deste tecido, dependem de um fornecimento adequado de G3P, necessário para a esterificação de AGs, sintetizados *de novo* pelo tecido ou pré-formados (reciclados após hidrólise dos TAG endógenos ou captados da circulação). Como no TAB, o TAM também possui três vias conhecidas de geração de G3P (ver Figura 1): a) a partir da glicose pela *via* glicolítica; b) a partir de intermediários de 3

carbonos (como lactato, piruvato e aminoácidos glicogênicos) pela *via* gliceroneogênica; c) por fosforilação direta do glicerol (resultante da hidrólise de TAG ou captado da circulação) pela GK.

Dessas três vias a primeira é a classicamente reconhecida. Vários estudos demonstram que a utilização de glicose pelo TAM é controlada diretamente pela insulina e pelo simpático (Himms-Hagen, 1989; Shimizu *et al.*, 1991, Shimizu *et al.*, 1998). Nos ratos adaptados à dieta HP, a captação de glicose e o conteúdo do transportador de glicose estimulado pela insulina (GLUT-4) encontram-se diminuídos. A substituição desta dieta por uma balanceada durante 24 horas é suficiente para restaurar a captação de glicose no TAM para valores acima daqueles dos animais controles sem modificar o conteúdo do GLUT-4. A desnervação simpática do TAM reduz (50%) a captação de glicose nos animais controles, mas não modifica a reduzida captação de glicose nos animais alimentados com a dieta HP (Kawashita *et al.*, 2002^a). Desta forma, no TAM dos animais adaptados à dieta HP, a captação de glicose é controlada principalmente pelos níveis plasmáticos de insulina.

Estudos realizados na década de 60 demonstraram que a *via* gliceroneogênica e a enzima PEPCK estavam presentes no TAM de ratos, tendo sido encontrada uma maior velocidade de incorporação de 1- e 2-¹⁴C- piruvato em glicerol de TAG e na atividade da PEPCK neste tecido durante o período de amamentação (Hahn *et al.*, 1968^a; Hahn *et al.*, 1968^b). Posteriormente, este mesmo grupo de pesquisa ofereceu aos animais uma dieta hiperlipídica sem carboidratos, por 24 horas, e demonstraram um aumento de cerca de 400 vezes na atividade da PEPCK do TAM quando comparado com os animais controles (Hahn *et al.*, 1973). No entanto, a importância *in vivo* da gliceroneogênese para a síntese de G3P no

TAM foi demonstrada pela primeira vez em estudos do nosso laboratório, tendo sido verificado que esta via é muito ativa no TAM de ratos alimentados com dieta balanceada e aumenta, juntamente com a atividade da PEPCK, em ratos adaptados à dieta HP. Nestes experimentos foi também verificado que o glicerol sintetizado a partir da gliceroneogênese foi utilizado principalmente para esterificar AGs pré-formados (Brito *et al.*, 1999). Mais recentemente foi verificado que, assim como no TAB, a gliceroneogênese no TAM encontra-se ativada no jejum e no diabetes (Festuccia *et al.*, 2003^a). Estas três situações (jejum, diabetes e adaptação à dieta HP) apresentam, além da reduzida disponibilidade de carboidratos, uma diminuição na atividade simpática para o TAM (Hayashi *et al.*, 1993; Brito *et al.*, 1998). O aumento do fluxo simpático para o TAM, provocado pela exposição dos animais ao frio (10 dias), em ratos alimentados com a dieta balanceada, também promove um aumento na gliceroneogênese, avaliada tanto pela atividade da PEPCK quanto pelo fluxo da via, determinado *in vitro* pela velocidade de incorporação de piruvato em glicerol-TAG e *in vivo* pela administração simultânea de ¹⁴C-glicose e ³H₂O (Moura *et al.*, 2005).

Os resultados obtidos nos animais adaptados à dieta HP, jejuados e diabéticos sugerem que a gliceroneogênese no TAM é sensível à disponibilidade de glicose, ou seja, essa via parece ser estimulada para compensar a reduzida síntese de G3P a partir da hexose e vice-versa. No entanto, os experimentos realizados *in vivo* nos animais expostos ao frio por 10 dias, situação em que os níveis plasmáticos de insulina também se encontram reduzidos, mostram que o TAM é capaz de ativar simultaneamente as três vias de geração de G3P. Considerando a pronunciada ativação da hidrólise dos TAG induzida pelo frio, foi sugerido que a geração de G3P

a partir de glicose e glicerol, embora aumentada, não foi suficiente para manter uma adequada síntese e armazenamento de TAG no TAM (Moura *et al.*, 2005).

Apesar dos ratos expostos ao frio apresentarem uma gliceroneogênese elevada, nosso laboratório tem obtido evidências que esta via de geração de G3P no TAM não está sob controle direto do SNS. A desnervação unilateral do TAM não afeta a atividade da PEPCK em ratos alimentados com dieta balanceada ou com a dieta HP, situação em que a atividade da PEPCK está elevada (Festuccia *et al.*, 2003^a). Além disto, a desnervação não interfere com a restauração da atividade da PEPCK no TAM de ratos adaptados com a dieta HP para níveis de controle depois da substituição desta dieta pela alimentação balanceada (Kawashita *et al.*, 2002^c).

Os primeiros estudos relacionados ao esclarecimento do controle do processo de fosforilação direta do glicerol no TAM demonstram que a administração de algumas substâncias lipogênicas como glicose, insulina e glicerol, por trinta minutos, promove um aumento significativo na atividade da GK no TAM em ratos (Persico *et al.*, 1975). Também foi demonstrado que a exposição prolongada (3 meses) de ratos ao frio induz um aumento da atividade desta enzima no TAM (Bertin *et al.*, 1984). Mais recentemente, estudos deste laboratório demonstram que tanto a atividade como a expressão da GK do TAM estão sob controle direto do SNS (Kawashita *et al.*, 2002^b; Festuccia *et al.*, 2003^b). A atividade da GK diminui acentuadamente após a desnervação do tecido e aumenta em situações, como a exposição ao frio, em que o fluxo simpático para o TAM é elevado (Brito *et al.*, 1998). Efeitos semelhantes na atividade e na expressão da GK no TAM foram também obtidos pela infusão prolongada de noradrenalina ou de agonistas β -adrenérgicos, sendo esses efeitos inibidos por antagonistas β -adrenérgicos, mas não por antagonistas α -adrenérgicos (Festuccia *et al.*, 2003^b). Em ratos adaptados à dieta hiperprotéica, em que o fluxo

simpático para o TAM encontra-se reduzido (Brito *et al.*, 1998) a atividade da GK está diminuída, após desnervação simpática cirúrgica do tecido a atividade da enzima torna-se ainda menor (Kawashita *et al.*, 2002^b).

Apesar das vias geradoras de G3P pelo TAM terem sido investigadas em diferentes situações experimentais, algumas capazes de promover diminuição na atividade termogênica do TAM (jejum, diabetes e a adaptação à dieta hiperprotéica, sem carboidratos) e outras capazes de estimular (exposição dos animais ao frio), todas essas condições apresentam níveis plasmáticos de insulina reduzidos. Desta forma, para o esclarecimento do controle da produção de G3P torna-se necessário e interessante, sua investigação em ratos alimentados com a dieta hipercalórica, um modelo experimental capaz de promover um aumento simultâneo da atividade termogênica do TAM e dos níveis plasmáticos de insulina.

Objetivos

2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo principal esclarecer, no tecido adiposo branco (TAB) e marrom (TAM), o efeito da dieta hipercalórica nas três vias de produção de glicerol-3-fosfato (G3P), metabólito necessário para a esterificação dos ácidos graxos e armazenamento do triacilglicerol (TAG).

Os objetivos específicos abordados no desenvolvimento deste trabalho foram os seguintes:

1) Investigar o efeito de uma dieta hipercalórica e hiperlipídica:

- ✓ no estado funcional do TAM interescapular: peso, conteúdo protéico total e mitocondrial, conteúdo de gordura do tecido, velocidade de renovação de noradrenalina e ligação mitocondrial de GDP.
- ✓ na velocidade de renovação de noradrenalina do TAB retroperitoneal e epididimal.
- ✓ em processos metabólicos envolvidos na síntese e armazenamento de TAG no TAM e no TAB retroperitoneal e epididimal:
 - na atividade da gliceroquinase (GK) e da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK);
 - na velocidade de incorporação de glicerol-U-¹⁴C e 1-¹⁴C-piruvato na fração glicerol de triacilgliceróis, *in vitro*;
 - na velocidade de utilização de 2-desoxi-1-¹⁴C-glicose *in vivo*;
 - na síntese *de novo* de ácido graxo *in vivo* e na atividade da lipase lipoprotéica.

2) Investigar o efeito da desnervação do TAM e do TAB retroperitoneal nas alterações metabólicas induzidas pela dieta hipercalórica nas vias de geração de G3P, avaliando:

- a atividade da GK e da PEPCK;
- a velocidade de incorporação de 1-¹⁴C-piruvato na fração glicerol de triacilgliceróis;
- a velocidade de utilização de 2-desoxi-1-¹⁴C-glicose *in vivo*.

Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1. Animais e seu Tratamento

3.1.1 Dieta Hipercalórica

Ratos machos Wistar com peso inicial variando de 45 a 60 gramas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP foram mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica & Imunologia em ambiente com ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura controlada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), sendo acondicionados aos pares em gaiolas que permitiam a medida diária da quantidade de alimento e do volume de líquido ingeridos. Ao grupo experimental foi oferecida por cerca de 24 dias uma dieta hipercalórica do tipo cafeteria, obtida pela suplementação de uma dieta balanceada comercial com diversos ingredientes palatáveis. A cada dia, quatro ingredientes diferentes, entre doze itens previamente selecionados (Tabela I), foram oferecidos aos animais, sendo que todos os itens apresentavam densidade calórica superior à da dieta comercial (Rothwell *et al.*, 1982°). A água dos animais do grupo experimental foi acrescida de sacarose 20%. Os ratos controles receberam a dieta balanceada comercial (Nuvital®) e água *ad libitum*.

A distribuição dos macronutrientes e a densidade calórica de cada um dos itens alimentares oferecidos aos animais cafeteria foram obtidos da tabela de informações nutricionais presente no rótulo dos alimentos (Tabela I). A distribuição dos macronutrientes e a densidade calórica da ração comercial Nuvital® foram fornecidas pelo produtor (Tabela I).

Todos os experimentos foram realizados em ratos alimentados, pesando cerca de 230 g, entre 8:00 e 10:00.

Tabela 1 - Distribuição dos macronutrientes e densidade calórica dos alimentos oferecidos aos animais alimentados com a dieta cafeteria.

	Carboidrato (g/100g)	Lipídio (g/100g)	Proteína (g/100g)	Densidade Calórica (kcal/g)
Bala de Caramelo	72,70	9,09	18,18	4,45
Bacon	00,00	58,00	9,00	5,69
Batata Frita	45,00	35,00	5,00	5,15
Bis[®]	63,10	23,30	8,10	4,95
Bolacha de Maisena	62,50	12,50	7,50	4,02
Castanha-do-Pará	7,00	67,00	17,00	6,99
Chocolate	50,00	33,30	10,00	5,40
Chocooky[®]	63,33	23,33	3,33	5,00
Pé de Moleque	58,82	26,47	11,76	5,29
Snacks[®]	65,00	17,50	7,50	4,50
Torrada	73,33	6,67	13,33	4,00
Torrone	80,00	7,50	10,00	3,80
Ração Nuvital[®]	55,00	4,50	22,00	2,85

Os ratos do grupo cafeteria receberam água *ad libitum* acrescida de sacarose 20%.

3.1.2 Técnica de desnervação unilateral cirúrgica do TAMI

A desnervação unilateral cirúrgica do TAMI consistiu da secção dos cinco nervos intercostais, responsáveis pela inervação simpática, do lobo direito do tecido através de pequena incisão no dorso do animal sob anestesia, mantendo intactos os nervos do lado contralateral. Foster *et al.* (1982) demonstraram que a inervação simpática cruzada entre os dois lados do TAMI é insignificante, pois a desnervação de apenas um dos lados causa redução de 95% do conteúdo de noradrenalina no lado desnervado, sem afetar praticamente o conteúdo de noradrenalina no lado contralateral intacto. O conteúdo residual de noradrenalina encontrado pode ser atribuído à pequena percentagem de fibras simpáticas que penetram no tecido, por vias diferentes dos nervos intercostais. Os ratos foram utilizados nos procedimentos experimentais sete dias após a cirurgia.

3.1.3 Técnica de desnervação cirúrgica unilateral no TAB retroperitoneal

A desnervação cirúrgica unilateral no TAB retroperitoneal consistiu de uma incisão ventral na parede abdominal e afastamento do rim e de órgãos adjacentes, para melhor visualização dos nervos que chegam ao tecido adiposo retroperitoneal esquerdo. Os nervos foram seccionados antes e depois de atravessarem o tecido, sendo a porção intermediária removida (modificado de Cantu & Goodman, 1967). O tecido retroperitoneal direito foi mantido intacto e utilizado como controle. Os experimentos foram realizados sete dias após a cirurgia.

3.2. Determinação do conteúdo de ácidos graxos totais da carcaça

Os animais controles e alimentados com a dieta cafeteria foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram seus tubos digestivos retirados desde a porção terminal do esôfago até o ânus, para que o conteúdo alimentar não interferisse nas determinações. As carcaças foram pesadas e digeridas em KOH 6N. Após a digestão completa, o conteúdo total foi filtrado e adicionado álcool absoluto, resultando em uma solução KOH-etanol 50%. Uma amostra desta solução foi lavada repetidamente com éter de petróleo, acidificada e submetida à uma nova extração com éter de petróleo, sendo a fase superior coletada em placas de petri previamente pesadas para determinação dos ácidos graxos totais pelo método gravimétrico.

3.3. Determinação do conteúdo lipídico do TAMI e do fígado

A extração foi realizada pelo método de Folch *et al.* (1957). O fígado (1 g) e o TAMI, limpo do tecido muscular e adiposo branco aderente, foram homogeneizados em clorofórmio:metanol (2:1). Em seguida, o material foi filtrado utilizando papel Whatman nº 1 e ao filtrado foi adicionado água deionizada. Após separação da fase clorofórmica e aquosa, uma alíquota da fase clorofórmica foi transferida para tubos previamente pesados para evaporação à 50° C. A quantificação da gordura foi obtida pelo método gravimétrico.

3.4. Determinação dos níveis plasmáticos insulina, proteínas totais, glicose, triacilglicerol e ácidos graxos livres:

As concentrações de insulina plasmática de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria foram determinadas por radioimunoensaio utilizando o Kit DPC® - Diagnostic Products Corporation. A concentração de proteínas totais plasmáticas foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951). A medida da

glicemia foi realizada pelo método da glicose oxidase utilizando o kit Glucos 500 (Dole Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda). Os níveis de triacilgliceróis plasmáticos foram determinados utilizando o kit Labtest (Labtest Diagnóstica S.A.). A concentração plasmática de ácidos graxos livres foi medida por titulação com base fraca segundo o método de Dole & Meinertz (1960).

3.5 Velocidade de renovação de noradrenalina

A velocidade de renovação de noradrenalina foi avaliada no TAMI e do TAB retroperitoneal e epididimal de ratos controles e alimentados com a dieta *cafeteria* medindo a velocidade de queda da concentração de noradrenalina após 6 e 12 horas de administração intraperitoneal de α -metil-éster-tirosina (300mg . Kg⁻¹ Sigma[®] Chemical), um inibidor da síntese de noradrenalina, que bloqueia a atividade da tirosina hidroxilase. O grupo 12 h recebeu uma segunda dose da droga (150 mg . Kg⁻¹) 6 horas após a primeira administração e o grupo 0 h não recebeu o tratamento com α -metil-éster-tirosina.

Após cada um dos tempos de administração de α -metil-éster-tirosina, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os tecidos adiposos TAB retroperitoneal e epididimal e TAMI removidos e homogeneizados em ácido perclórico 1,72%, contendo metabissulfeto de sódio 1% e EDTA 0,04%. O homogenado foi centrifugado sob refrigeração a 3000 g durante 10 min e o sobrenadante transferido para novo tubo, contendo tampão Tris 24,2% (pH 8,9), 0,5% de metabissulfito de sódio, 2,5% de EDTA, alumina previamente ativada a 100°C durante 30 minutos e diidroxibenzilamina (padrão interno). As amostras foram agitadas durante 20 minutos, centrifugadas e, após aspiração do sobrenadante, a alumina foi lavada repetidamente com uma solução contendo EDTA 0,004%,

metabissulfito de sódio 0,02% e Tris 0,06%. As catecolaminas foram extraídas da alumina pela adição de solução eluidora contendo ácido perclórico 0,86N, metabissulfito de sódio 0,019% e EDTA Na₂ 0,02%, sob agitação por 10 minutos (Krstulovic, 1982). O conteúdo de noradrenalina foi determinado por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em um cromatógrafo modelo LC-7A, equipado com uma coluna de fase reversa Spherisorb ODS-II (Sigma-Aldrich), acoplado a um detector eletroquímico modelo L-ESD-6A e um polígrafo modelo C-R5A, todos da marca Shimadzu.

A velocidade de renovação (VR) da noradrenalina é o produto da concentração de noradrenalina no tempo 0 [NOR₀] pela velocidade de renovação fracional (*k*):

$$VR = k \cdot [NOR_0]$$

Após o bloqueio da síntese pela α -metil tirosina, o declínio na concentração de noradrenalina no TAMI é dado pela seguinte equação:

$$[NOR] = [NOR_0] e^{-kt}$$

O valor de *k* pode ser determinado pelo cálculo da regressão linear dos logaritmos naturais da concentração de noradrenalina *versus* o tempo (Costa *et al.*, 1966).

O intervalo de 95% de confiança da velocidade de renovação (VR) da noradrenalina foi determinado da seguinte maneira:

a) o intervalo de confiança do valor médio da velocidade de renovação fracional (*k*) e da concentração de noradrenalina no tempo 0 [NOR₀] foi estabelecido utilizando o erro padrão da média de cada um dos fatores;

b) Os limites inferiores da velocidade de k e da $[NOR_0]$ foram multiplicados para determinação do limite inferior do intervalo de 95% de confiança da velocidade de renovação (VR) da noradrenalina.

c) Os limites superiores de k e da $[NOR_0]$ foram multiplicados para determinação do limite superior do intervalo de 95% de confiança da velocidade de renovação (VR) da noradrenalina (Taubin *et al.*; 1972).

3.6 Isolamento das mitocôndrias do TAMI

O TAMI foi homogeneizado em tampão, contendo 300 mM de sacarose, 2mM de EDTA e 10 mM de Tris-HCl em pH 7,2 e centrifugado a 8500 g por 10 minutos. A camada de gordura e o sobrenadante foram descartados por inversão rápida do tubo e o precipitado ressuspense no volume original. A suspensão foi centrifugada a 700g por 10 minutos e posteriormente o sobrenadante foi transferido para novo tubo e o precipitado descartado. Em seguida, o sobrenadante foi centrifugado a 8500g por 10 minutos (Cannon *et al.*; 1979).

3.6.1 Ligação mitocondrial de GDP

Após isolamento das mitocôndrias do tecido adiposo marrom interescapular (item 3.3), o precipitado mitocondrial foi diluído em uma pequena quantidade de tampão e a concentração de proteína mitocondrial determinada usando albumina bovina como padrão (Lowry *et al.*; 1951).

As mitocôndrias foram suspensas em tampão sacarose 0,25M, de modo que a concentração final fosse de 8 a 10 mg de proteína por mL. Em seguida, as mitocôndrias foram incubadas em meio contendo 100 mM de sacarose, 20 mM de Tris-HCl, 10 mM de cloreto de colina, 5 μ M de rotenona, 0,05 μ Ci de $[^{14}C]$ -inulina e

0,65 μCi de [^3H]-GDP, em pH 7,1; de acordo com NICHOLLS, 1976. A [^{14}C]-inulina foi utilizada para corrigir a quantidade de [^3H]-GDP retido no espaço extracelular.

Após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente (25°C), o meio de incubação foi filtrado rapidamente, por meio de uma bomba de sucção, através de um filtro de membrana de nitrato de celulose (Sartorius Membran Filter, type SM 11 406, size 25, pore size 0,45, charge n° 591 086 572 –576). Os filtros foram adicionados diretamente em frascos contendo líquido de cintilação SX20-5 (FISHER SCIENTIFIC). Após agitação por aproximadamente 3 horas os filtros e as mitocôndrias se desagregaram, possibilitando a contagem do ^3H e ^{14}C das amostras (Nicholls, 1976).

3.6.2 Conteúdo da UCP-1

Após isolamento das mitocôndrias do tecido adiposo marrom (TAM), o precipitado mitocondrial foi ressuspensão vagarosamente em tampão, contendo Tris-HCl 25mM pH 7,4, uréia 7M, tiouréia 2M, etilfenilpolietileno glicol (NONIDET® P40) 4% e glicerol 5%, e centrifugado a 17.000g durante 10 minutos em temperatura ambiente. O infranadante foi transferido para membrana de diálise e mantido sob agitação em condições refrigeradas em tampão Tris-HCl 25mM pH 7,4 durante ~14 horas, sendo o tampão renovado 3 vezes. Após a diálise, as amostras foram centrifugadas a 17.000g durante 10 minutos e o precipitado ressuspensão em pequeno volume de tampão da amostra contendo Tris-HCl 62,5mM pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,05% e β -mercaptoetanol 5%.

A eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS foi realizada de acordo com o método descrito por Laemmli (1970). As amostras foram aquecidas a 100° C por 2 minutos e aplicadas em sistema de mini-gel (modelo mini protean II cell – Bio Rad®)

de acrilamida-bisacrilamida (30:0,8) com 0,75mm de espessura, gel de separação de 10% e empilhamento de 4%. O padrão de peso molecular da Promega® (Broad Range Protein Molecular Markers: 10-225 kDa) foi utilizado. As corridas eletroforéticas foram realizadas em cubas de acrílico contendo tampão Tris-HCl 25mM pH 8,3, glicina 115mM, SDS1% sob 120 V e interrompidas quando faltava cerca de 3mm para a banda do corante deixar o gel de separação. Após a corrida eletroforética, um dos géis foi retirado das placas de vidro e transferido para o fixador de proteínas (ácido tricloroacético 10%) a 4°C por 1 hora. Em seguida, as proteínas contidas no gel foram coradas por 12 horas com a solução de *Coomassie Blue R 2%* (m/v), diluído em etanol 50% e ácido acético glacial 10%. O gel foi descorado várias vezes em solução de etanol 25% e ácido acético 10% e, a seguir preparado para secar em outra solução, contendo etanol 50% e glicerol 2%, por 60 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, o gel foi colocado entre duas folhas de papel celofane previamente molhadas, contendo gelatina 5% e preso em suporte apropriado, permanecendo à temperatura ambiente para secar.

Após a eletroforese, o outro gel foi preparado para a transferência de acordo com o método descrito por Towbin *et al.* 1979. Inicialmente, o gel foi colocado na solução de transferência (Tris-HCl 25mM pH 8,3, glicina 192mM e etanol 20%) por cerca de 30 minutos, juntamente com as esponjas, os papéis 3MM de prensagem e a membrana de PVDF (Amersham Hybond-P Biosciences UK England HP7 9NA), previamente tratada com metanol 100% por 10 segundos. As proteínas presentes no gel foram transferidas (direção pólo negativo para pólo positivo) para uma membrana de PVDF em um sistema montado na seguinte seqüência: primeira placa de acrílico, esponja, 3 folhas de papel 3MM, gel, membrana de PVDF, 3 folhas de papel 3MM, esponja e segunda placa de acrílico. A transferência ocorreu sob uma

voltagem inicial de 100V, corrente inicial de cerca de 200mA, por cerca de 3 horas à temperatura ambiente com resfriamento do tampão. Após o término da transferência, a membrana de PVDF foi corada com Ponceau S a 0,25% em ácido acético 1% por 5 minutos e lavada com água para visualização das proteínas e dos padrões de pesos moleculares. Posteriormente, a membrana de PVDF foi descorada com PBS (Tampão Fosfato 10mM, KCl 2,7mM e NaCl 137mM pH 7,4) e incubada *overnight* a 4°C com leite desnatado em pó 5% diluído em Tris HCl 50mM pH 7,5, contendo antifoam 0,01%, thimerosal 0,0001% e Tween-20 0,30%. Após o bloqueio, a membrana de PVDF foi lavada 3 vezes durante 5 minutos com PBS, pré-incubada por 30 minutos com leite desnatado em pó 5% diluído em Tris HCl 50mM pH 7,5, NaCl 150mM e Tween-20 0,05% e incubada por 3 horas à temperatura ambiente no mesmo tampão acrescido do anticorpo primário, cabra anti-UCP1 de rato (Santa Cruz Biotechnology, California, 95060, USA) na diluição 1:350. O tampão foi desprezado e a membrana lavada 3 vezes durante 5 minutos com PBS para retirar o excesso de anticorpo primário. Em seguida, a membrana foi incubada por 90 minutos, à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário (coelho anti-IgG de cabra) conjugado à peroxidase (Sigma Chemical, St. Louis, MO 63178, USA) na diluição 1:5000 e novamente lavada três vezes durante 15 minutos com PBS.

Em seguida, a membrana foi incubada por 5 minutos com a mistura de reagente (1:1) do *kit* quimiluminescência amplificada (ECL, Amersham Biosciences UK England HP7 9NA), o excesso de reagente foi removido e a revelação realizada em filme autorradiográfico (Hyperfilm ECL[®]), na ausência de luz, durante 3 minutos.

A análise da densitometria foi realizada utilizando o programa LabImage e os resultados expressos em unidades arbitrárias. O termo unidade arbitrária refere-se ao valor densitométrico da banda referente à UCP-1 na membrana corrigido pelo

valor densitométrico total referente às proteínas mitocondriais no gel réplica para a mesma amostra.

3.7. Síntese *de novo* de ácidos graxos *in vivo*

A rápida distribuição da água tritiada no organismo e a manutenção da atividade específica constante por longos períodos, tanto no plasma como nos tecidos, faz com que a $^3\text{H}_2\text{O}$ seja a molécula radioisotopicamente marcada de preferência para o estudo da lipogênese *in vivo*. A incorporação do trítio ocorre durante a síntese de ácidos graxos em ligações estáveis C-H, por meio da troca de ^3H da água com os H dos nucleotídeos de pirimidina reduzidos (NADPH).

A fórmula utilizada para o cálculo da velocidade de síntese de ácidos graxos é a seguinte:

$$\text{nmol de AG/min} = \frac{\text{DPM de } ^3\text{H incorporado em AG}}{\text{DPM } ^3\text{H} / \text{átomo-g de H na água corporal}} \times \frac{10^9}{3,3} \times \frac{1}{60}$$

A fórmula acima é baseada nas premissas de Windmueller & Spaeth (1966). A atividade específica da água tritiada (DPM de $^3\text{H} \div \text{mL de H}_2\text{O}$) é obtida a partir da radioatividade plasmática, considerando que cada mL de plasma contém 0,94 mL de água. O fator $10^9 \div 13,3$ corrige a discriminação isotópica e converte átomo-grama de hidrogênio em nmol de ácidos graxos com 16 átomos de carbono sintetizados. O cálculo pressupõe que metade de todos os átomos de hidrogênio são provenientes da água. Esta técnica estima a lipogênese a partir de todas as unidades de dois carbonos, independente do tipo de substrato utilizado.

Para determinação da síntese de ácido graxo *de novo* foi administrada água tritiada (5mCi dissolvidos em 0,5mL de salina) através da veia jugular direita em animais canulados (Harms & Ojeda, 1974) dois dias antes do experimento. Após uma hora da administração da $^3\text{H}_2\text{O}$, os animais foram sacrificados por decapitação e o sangue coletado em tubos heparinizados para obtenção do plasma e determinação da atividade específica da água. O TAB (retroperitoneal e epididimal) e o TAMI foram pesados, lavados com solução fisiológica e armazenados em clorofórmio:metanol (2:1). A extração dos lipídios totais e isolamento dos ácidos graxos de TAG foram realizados conforme detalhado no item 3.7.

3.8. Índice de captação de glicose *in vivo*

A captação de glicose *in vivo* foi estimada usando a 2-desoxi-1- ^{14}C -glicose, como descrito por Ferré *et al.* (1985), que se baseia no modelo descrito por Sokoloff *et al.* (1977). A 2-desoxiglicose é transportada para dentro das células pelos mesmos transportadores de glicose (Bidder, 1968; Bachelard *et al.* 1971; Horton *et al.* 1973) e compete com a glicose pelo sítio ativo da hexoquinase, sendo fosforilada a 2-desoxiglicose-6-fosfato, que, no entanto, não é substrato da fosfoglicoisomerase e nem da glicose-6-fosfato desidrogenase (Wick *et al.* 1967; Horton *et al.* 1973). A quantificação de 2-desoxiglicose-6-fosfato nos dá, portanto, a idéia da velocidade de captação de glicose pela célula. Este método não é utilizado em tecidos com atividade apreciável de glicose-6-fosfatase (como, por exemplo, o fígado) uma vez que a 2-desoxiglicose-6-fosfato pode ser defosforilada por esta enzima (Sols *et al.* 1954; Horton *et al.* 1973; Ferré *et al.* 1985).

Dose traço de 2-desoxi-1- ^{14}C -glicose (30 μCi dissolvidos em 0,5 mL de salina) foi administrada através da veia jugular direita em animais canulados (Harms &

Ojeda, 1974) dois dias antes do experimento e amostras de sangue foram coletadas nos tempos 1, 3, 5, 10, 20, 40 e 60 minutos. Após a última coleta, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

O plasma foi utilizado para a determinação da glicemia pelo método da glicose oxidase e para a determinação da radioatividade da 2-desoxi-1-¹⁴C-glicose por meio de contador de cintilação líquida. A atividade específica da glicose foi calculada em cada um dos tempos coletados e a porcentagem de queda da atividade específica *versus* tempo representada em gráfico (curva exponencial de 1ª ordem) para o cálculo da integral.

Para a determinação do conteúdo de 2-desoxi-1-¹⁴C-glicose-6-fosfato no tecido, o método utilizado se baseia na solubilidade da 2-desoxiglicose e da 2-desoxiglicose-6-fosfato em HClO₄ 6% e na solubilidade apenas da 2-desoxiglicose no reagente de Somogy [Ba(OH)₂/ZnSO₄], sendo a 2-desoxiglicose-6-fosfato adsorvida e precipitada (Kipnis *et al.* 1959). O TAB retroperitoneal e epididimal e o TAMI foram pesados, lavados em solução fisiológica e colocados em tubos de polietileno contendo NaOH 1M. As amostras foram digeridas a 60°C e neutralizadas posteriormente com HCl 1M. Duas alíquotas de cada homogenado foram separadas, adicionado HClO₄ 6% ou Ba(OH)₂/ZnSO₄, centrifugadas a 1.500 g por 20 minutos e o sobrenadante separado para contagem da radioatividade. O conteúdo de 2-desoxi-1-¹⁴C-glicose-6-fosfato foi determinado pela diferença entre a contagem radioativa das duas alíquotas.

O índice de captação de glicose foi expresso em ng de glicose. mg de tecido⁻¹ . min⁻¹ e calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Captação de glicose} = (\text{DPM} \cdot \text{mg tecido}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}) \cdot (\text{ae } 1 \text{ min. relação de áreas})^{-1}$$

Sendo que $DPM \cdot mg \text{ de tecido}^{-1} \cdot min^{-1}$ refere-se a radioatividade da 2-desoxi-1- ^{14}C -glicose-6-fosfato; $ae \ 1 \ min$ refere-se a atividade específica da 2-desoxi-1- ^{14}C -glicose no tempo 1 min após sua administração; e a *relação de áreas* refere-se à relação da área sob a curva da atividade específica da 2-desoxi-1- ^{14}C -glicose pela área total do gráfico (veja figura 6).

3.9. Incorporação de 1- ^{14}C -piruvato e glicerol-U- ^{14}C em glicerol de TAG

3.9.1 Fragmentos do Tecido Adiposo Marrom

O TAMI foi cortado em pequenos fragmentos e incubado em tampão Krebs-Henseleit livre de cálcio (pH 7,4), contendo ou glicerol-U- ^{14}C (1mM, 1 μ Ci) ou piruvato-1- ^{14}C (1mM, 1 μ Ci) a 37° C em atmosfera de 95% de O₂ e 5% de CO₂ com agitação contínua durante 2 horas. A reação foi interrompida com H₂SO₄ 6N, e em seguida, os fragmentos do TAMI foram lavados com solução fisiológica e homogeneizados em clorofórmio:metanol (2:1) (Folch *et al.*; 1957). Posteriormente este material foi filtrado e ao filtrado foi adicionada água deionizada (10:2). A extração dos lipídios totais foi realizada conforme detalhado no item 3.7.

A incorporação de 1- ^{14}C -piruvato ou glicerol-U- ^{14}C em glicerol de TAG (nmol . g TAMI⁻¹ . 2h⁻¹) foi determinada pela diferença de incorporação em lipídios totais e ácidos graxos.

3.9.2 Adipócitos isolados

Para isolamento dos adipócitos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e, em seguida, os TAB retroperitoneal e epididimal foram removidos até a obtenção de ~ 5g. Após a fragmentação do tecido, os adipócitos

foram isolados com colagenase (Worthington 128U/mg), de acordo com o método de Rodbell (1964), em um tampão Krebs-Henseleit livre de cálcio, contendo 137mM de NaCl; 4,2mM NaHCO₃; 0,4mM de MgSO₄.7 H₂O; 0,5mM de MgCl₂. 6 H₂O; 0,4mM de KH₂PO₄; 5,4mM de KCl, adicionado de 1% de albumina bovina livre de ácidos graxos, 27mM de HEPES e 0,55mM de glicose, pH 7,4. A colagenase foi adicionada na proporção de 1,5 mg para 1,5 mL do tampão para cada grama de tecido. Após incubação de 30 min a 37°C, sob agitação constante, os adipócitos foram filtrados em meia de “nylon” e em seguida lavados repetidamente com tampão Krebs-Henseleit-Hepes sem glicose para remoção da colagenase. Os adipócitos foram separados do tampão por flotação. O número de células foi determinado por contagem em câmaras de Neubauer em microscópio.

Após centrifugação os adipócitos isolados (~600.000) foram incubados em tubos com tampão Krebs-Henseleit-Hepes, acrescido de U-¹⁴C-glicerol (1mM, 1 µCi) ou 1-¹⁴C-piruvato (1mM, 1 µCi). Após incubação (1h), a 37°C sob agitação constante, a incorporação foi interrompida por choque térmico (~ 2°C). As células foram lavadas com salina para retirar o restante da marca não utilizada pelas células e colocadas em clorofórmio:metanol (2:1). A extração dos lipídios totais foi realizada conforme detalhado no item 3.7.

3.10 Extração dos lipídios totais

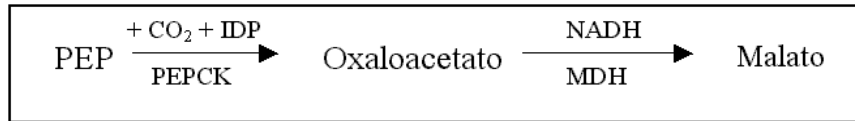
A extração dos lipídios totais foi realizada pelo método de Folch *et al.*; 1957. Após repouso, a fase superior foi aspirada e a fase inferior lavada 3 vezes com a mistura da fase superior, preparada com clorofórmio, metanol e mistura salina na proporção 21,1:337:330 (mL). A mistura salina continha CaCl₂ 0,04%; MgCl₂ 0,034% e NaCl 0,58%. Para determinação da incorporação do ¹⁴C ou ³H em lipídios totais

uma alíquota do extrato clorofórmico foi evaporado e o resíduo dissolvido em líquido de cintilação SX20-5 (FISHER SCIENTIFIC). Para o isolamento dos ácidos graxos uma alíquota do extrato clorofórmico foi evaporado e os lipídeos saponificados com KOH etanólico [KOH saturada 14,5M (1mL) : etanol (20mL)]. Os tubos foram fechados com bolas de vidro e submetidos a aquecimento em banho-maria à temperatura de 70-80° C por duas horas. Após adição de água deionizada, os tubos mantidos à temperatura de 40-50°C até evaporação de todo o álcool. O material saponificado foi a seguir lavado três vezes com éter de petróleo para remoção dos lipídeos não saponificáveis por aspiração. Posteriormente o material foi acidificado com ácido perclórico 6% e os ácidos graxos extraídos com éter de petróleo. Todo o material etéreo foi evaporado e o resíduo dissolvido em líquido de cintilação SX20-5 (FISHER SCIENTIFIC) para contagem da radioatividade em cintilador Beckman LS 7600.

3.11. Medida das atividades enzimáticas

3.11.1 Fosfoenolpiruvato carboxiquinase

O TAMI e o TAB retroperitoneal e epididimal foram homogeneizados em tampão, contendo sacarose 0,2M; trietanolamina 20mM; 2-β-mercaptoetanol 5mM; EDTA 1mM (pH 7,5). O homogenado foi centrifugado a 10.000g à 4° C durante 10 minutos. A camada lipídica superior foi descartada e o sobrenadante novamente centrifugado a 100.000g (4° C) durante 30 minutos para obtenção da fração citosólica. A atividade da enzima foi determinada pela formação do malato, conforme descrito por Ballard & Hanson, 1967:



O meio de reação, contendo tampão imidazol pH 6,6 (100 μ mol); MnCl₂ (2 μ mol); GSH (1 μ mol); IDP (1,25 μ mol); NADH (2,5 μ mol); PEP (1,5 μ mol); MDH (2U); KHCO₃ (50 μ mol) e NaH¹⁴CO₃ (2 μ Ci), e os homogenados foram pré-incubados durante 5 minutos a 37° C. Os brancos da reação continham todos os componentes da mistura com exceção do IDP. A reação foi iniciada pela adição do homogenado e interrompida pela adição de 0,5mL de ácido tricloroacético 10% após 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 3.000g, transferidas para tubos de cintilação contendo HCl 2N. Estes tubos foram colocados em dessecador até completa evaporação do líquido. O malato formado foi dissolvido em água e, posteriormente, foi adicionado líquido de cintilação SX20-5 (FISHER SCIENTIFIC) para contagem da radioatividade. O resultado foi expresso por nmol.mg de proteína⁻¹.min⁻¹, sendo a dosagem protéica realizada pelo método BCA – Bicinchoninic acid – Pierce, USA (Smith *et al.*, 1985).

3.11.2 Gliceroquinase

O TAMI e o TAB epididimal e retroperitoneal foram homogeneizados em tampão, contendo KCl 1% e EDTA 1mM. Os homogenados foram centrifugados a 5000 rpm à 4°C por 10 minutos. O infranadante foi pré-incubado à 37° C durante 5 minutos. A atividade da enzima foi determinada conforme descrito por Newsholme *et al.* (1967). A mistura da reação continha ATP 6mM; MgCl₂ 4mM; EDTA 1mM; NaF 25mM; 2- β -mercaptoetanol 20mM; TRIS 100mM pH 7,5; albumina 1%; glicerol-U-¹⁴C 1mM (10 μ Ci/mL); fosfocreatina 10mM e creatina quinase (26,4U/mL). O ensaio foi

iniciado pela adição do homogenado e interrompida, após 30 minutos à 37° C pela adição de etanol 80%; no entanto, nos tubos “brancos” o etanol era colocado antes do homogenado. A separação do glicerol-¹⁴C do glicerofosfato-¹⁴C foi realizada em cromatografia de papel ascendente utilizando como solvente etanol, amônia e água (80:4:16), aplicando-se a mistura de reação em papel de cromatografia Whatman nº 1. Neste sistema, o glicerol não fosforilado move-se com a frente do solvente. O glicerolfosfato que permanece na origem foi determinado por meio da contagem em líquido de cintilação SX20-5 (FISHER SCIENTIFIC). O resultado foi expresso em nmol.mg de proteína⁻¹.min⁻¹, sendo a dosagem de proteína realizada conforme método de Lowry *et al.* (1951).

3.11.3 Lipase lipoprotéica

O ensaio da atividade enzimática da lipase lipoprotéica (LPL) foi baseado no método de Nilsson-Ehle e Schotz (1976), e fundamenta-se na reação:



As propriedades da LPL importantes para determinação da sua atividade enzimática são: inibição por NaCl 1M; ativação em pH alcalino (8,8) e requerimento da apolipoproteína C-II como cofator específico.

Após sacrifício dos animais por deslocamento cervical, o TAMI, TAB retroperitoneal e epididimal TAMI foram homogeneizados em sacarose 250mM, EDTA 1mM e heparina 20U/mL (pH 7,4). O homogenado foi centrifugado a 12.000rpm por 15 minutos e o sobrenadante, abaixo da camada gordurosa, foi utilizado para determinação da atividade da LPL (Hietanem & Greenwood, 1977). No

dia anterior ao ensaio, o substrato, contendo 69 mg de trioleína, 3,3mg de lisolecitina em clorofórmio e 12,5 μ Ci de trioleína-³H em tolueno, foi preparado. Após evaporar todos os solventes orgânicos à temperatura ambiente sob corrente de nitrogênio, foi adicionado glicerol e a mistura foi sonicada repetidamente. No momento do ensaio, a mistura de reação foi preparada, contendo 2 partes de substrato, 2 partes de tampão para LPL (Tris 0,2M, pH 8,8, albumina bovina 6% e NaCl 0,15M) e 1 parte de soro de rato jejuado por 36 horas (fonte de apolipoproteína C-II). Em todos os tubos foram adicionados 100 μ L da mistura de reação, no tubo branco foram acrescentados 150 μ L de água destilada, no tubo inibido 50 μ L de NaCl 5M e no desconhecido 50 μ L de água destilada, após agitação em vórtex e pré-incubação por 5 minutos a 37°C sob agitação (80 ciclos por min) a reação foi iniciada com o acréscimo de 100 μ L da amostra (exceto no branco). A reação foi interrompida aos 60 minutos com a adição de 3,25mL da mistura de extração de VAUGHAN [Belfrage & Vaughan, 1969 (clorofórmio-heptana-metanol 1,25:1,1:1,41)]. Após agitação em vórtex, 1mL de tampão carbonato-borato 0,1M pH 10,5 foi adicionado, em seguida a amostra foi agitada novamente em vórtex e centrifugada a 1000g por 10 min. Uma alíquota de 0,8mL da fase aquosa superior foi colocada em líquido de cintilação SX20-5 (FISHER SCIENTIFIC) para determinação da radioatividade.

A atividade enzimática da LPL dada em nmol de ácido oléico liberado por minuto a 37°C foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade da LPL} = (\text{DPM D} - \text{DPM I}) \cdot 60 \text{ min}^{-1} \cdot \text{ae da trioleína}^{-1} \cdot 3 \cdot (2,45 \cdot 0,8^{-1}) \cdot 0,76^{-1}$$

Sendo que *DPM* representa a radioatividade em 0,8 mL da fase superior, *D* o tubo desconhecido e *I* o tubo inibido; *ae* representa a atividade específica da trioleína expressa como DPM . nmol de trioleína⁻¹; *Fator 3* representa a correção da taxa

molar de ácido graxo liberado na hidrólise da trioleína; Fator 2,45 representa a correção do volume da fase superior; Fator 0,76 representa a correção da partição do ácido oléico no sistema de extração.

O resultado foi expresso em nmol de ácido oléico liberado.mg proteína⁻¹.min⁻¹, sendo a dosagem de proteína realizada conforme método de Lowry *et al.*; 1951.

3.12. Tratamento estatístico dos resultados

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão e as diferenças entre grupos foram analisadas utilizando o test *t* de Student, com $P < 0,05$ para nível de significância.

Resultados

4. Resultados

4.1 Ingestão calórica dos animais

Ratos Wistar receberam durante 24 dias uma dieta balanceada comercial (grupo controle) ou uma dieta do tipo cafeteria (grupo experimental) *ad libitum*. A água ingerida pelo grupo experimental foi acrescida de sacarose 20%. A partir do oitavo dia, a ingestão calórica dos animais foi avaliada em ambos os grupos (Figura 2). Durante todo o período analisado, os ratos alimentados com a dieta cafeteria apresentaram uma ingestão alimentar hipercalórica em relação aos animais controles. Em média, os ratos alimentados com a dieta controle ingeriram aproximadamente 50 Kcal por 100g de peso corporal por dia, enquanto os animais alimentados com a dieta cafeteria ingeriram aproximadamente 70 Kcal por 100g de peso corporal por dia.

4.2 Ganho de peso dos animais

O peso corporal dos animais controles e cafeteria (Figura 3) foi avaliado diariamente. O ganho de peso dos animais alimentados com a dieta cafeteria foi similar ao dos animais controles.

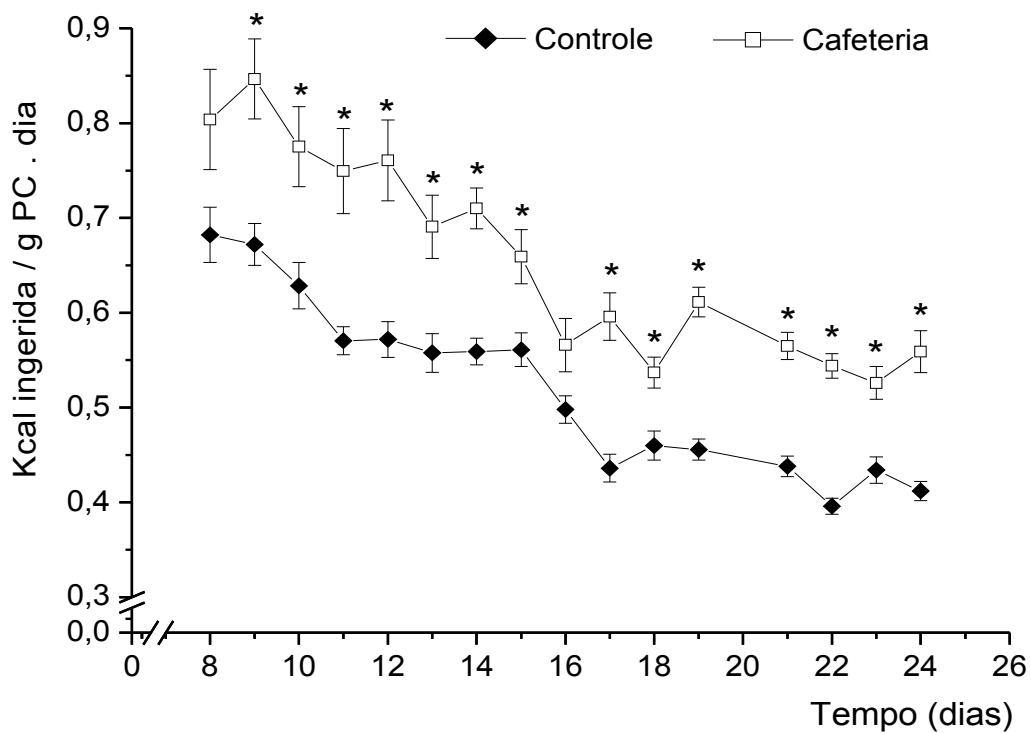


Figura 2. Ingestão calórica (Kcal ingerida . g peso corporal⁻¹ . dia⁻¹) de ratos alimentados com a dieta cafeteria e controle. Os valores representam a média \pm erro padrão de 10 animais e representa um experimento que foi repetido 3 vezes, sendo obtido resultados semelhantes. * $P < 0,05$ vs. controle.

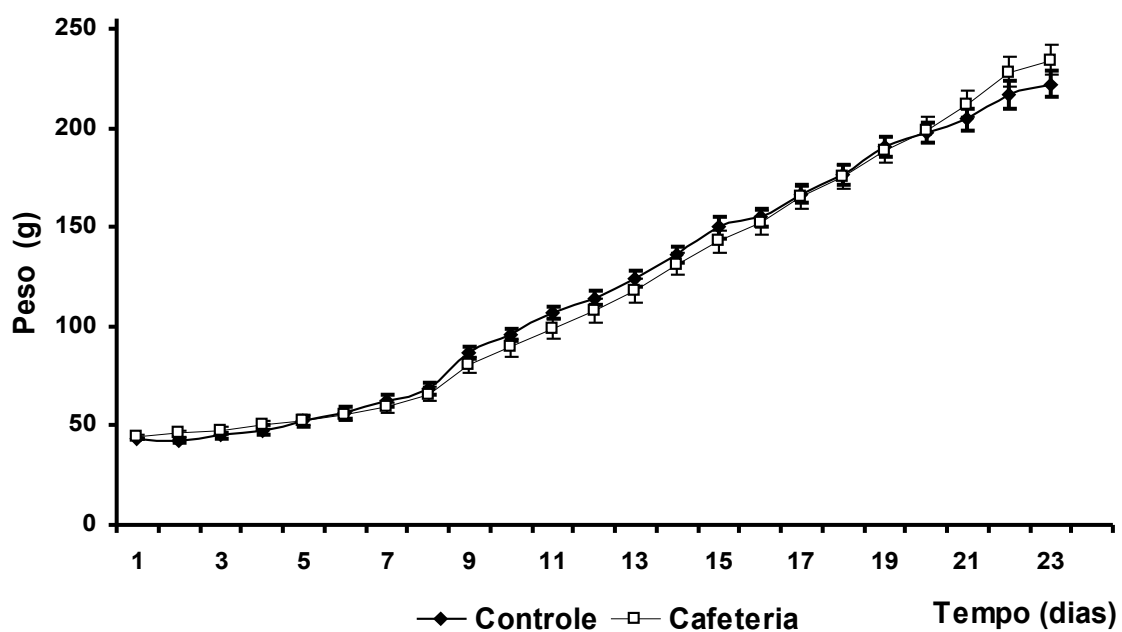


Figura 3. Peso corporal (g) de ratos alimentados com a dieta cafeteria e controle. Os valores representam a média \pm erro padrão de 10 animais e representa um experimento que foi repetido 3 vezes, sendo obtido resultados semelhantes.

4.3 Distribuição calórica da dieta ingerida pelos animais

A distribuição calórica média da dieta ingerida pelos animais controles e alimentados com a dieta cafeteria foi avaliada a partir do 8º dia de administração das dietas (Tabela 2). A dieta ingerida pelo grupo cafeteria apresentou uma distribuição calórica aproximadamente normoglicídica, hiperlipídica e hipoprotéica em relação à distribuição calórica da dieta ingerida pelos ratos controles, sendo este resultado expresso em quilocalorias provenientes de cada macronutriente por 100 quilocalorias ingerida pelos animais ($\text{Kcal} \cdot 100 \text{Kcal}^{-1}$). No entanto, a distribuição de calorias ingerida pelos animais alimentados com a dieta cafeteria pode ser classificada como hiperglicídica, hiperlipídica e normoprotéica, em relação aquela dos animais alimentados com a dieta comercial controle, se expressa em quilocalorias provenientes de cada macronutriente pela média da ingestão calórica diária dos animais ($\text{Kcal} \cdot \text{Kcal ingerida}^{-1}$).

Tabela 2 - Distribuição calórica da dieta ingerida pelos ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria

	Carboidratos (Kcal / 100Kcal)	Lipídios (Kcal / 100Kcal)	Proteínas (Kcal / 100Kcal)
Controle	63,13 ± 0,00	11,62 ± 0,00	25,25 ± 0,00
Cafeteria	65,48 ± 0,74	20,17 ± 0,76	14,35 ± 0,20

	Carboidratos (Kcal /Kcal ingerida)	Lipídios (Kcal /Kcal ingerida)	Proteínas (Kcal/Kcal ingerida)
Controle	31,56 ± 0,00	5,81 ± 0,00	12,62 ± 0,00
Cafeteria	45,83 ± 0,74	14,12 ± 0,76	10,05 ± 0,20

Os valores representam a média ± erro padrão de 10 animais e representa um experimento que foi repetido 3 vezes.

4.4 Níveis de glicose, insulina, triacilglicerol, ácidos graxos livres e proteínas totais plasmáticos

A dieta cafeteria não alterou os níveis plasmáticos de glicose, ácidos graxos livres e proteínas totais, mas induziu um aumento significativo dos níveis plasmáticos de insulina e de triacilglicerol (Tabela 3).

4.5 Conteúdo de ácidos graxos totais da carcaça e de lipídios totais hepático

Os animais alimentados com a dieta cafeteria apresentaram um aumento de aproximadamente 150% e 15% no conteúdo de ácidos graxos totais da carcaça e de lipídios totais hepático, respectivamente, em relação ao grupo controle (Tabela 4).

4.6 Peso de diferentes depósitos do tecido adiposo branco

Os animais alimentados com a dieta cafeteria apresentaram um aumento de aproximadamente 90%, 150%, 135% e 130% no peso do TAB epididimal, inguinal, mesentérico e retroperitoneal, respectivamente (Figura 4 e Tabela 5).

Tabela 3 - Níveis plasmáticos de glicose, insulina, triacilglicerol, ácidos graxos livres e proteínas totais de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria

	Controle	Cafeteria
Glicemia (mg/dL)	128 ± 5 (7)	135 ± 2 (7)
Insulina (µUI/mL)	32 ± 3 (8)	50 ± 5* (5)
Triacilglicerol (mg/dL)	68 ± 6 (9)	129 ± 15* (8)
Ácidos Graxos Livres (nmol/mL)	410 ± 40 (12)	490 ± 50 (11)
Proteínas Totais (mg/mL)	50 ± 1 (12)	49 ± 1 (12)

Os valores representam a média ± erro padrão. Os números entre parênteses representam o total de animais utilizados. * $P < 0,05$ vs controle.

Tabela 4 - Conteúdo de ácidos graxos totais da carcaça e de lipídios totais hepático nos ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria

	Controle	Cafeteria
Ácidos graxos (g) / Carcaça (100 g)	8,36 ± 0,86 (12)	21,13 ± 1,40 (12)*
Lipídios Totais Hepático (mg / g)	46,33 ± 0,79 (6)	53,70 ± 3,47 (6)*

Os valores representam a média ± erro padrão. Os números entre parênteses representam o total de animais utilizados. * $P < 0,05$ vs controle.

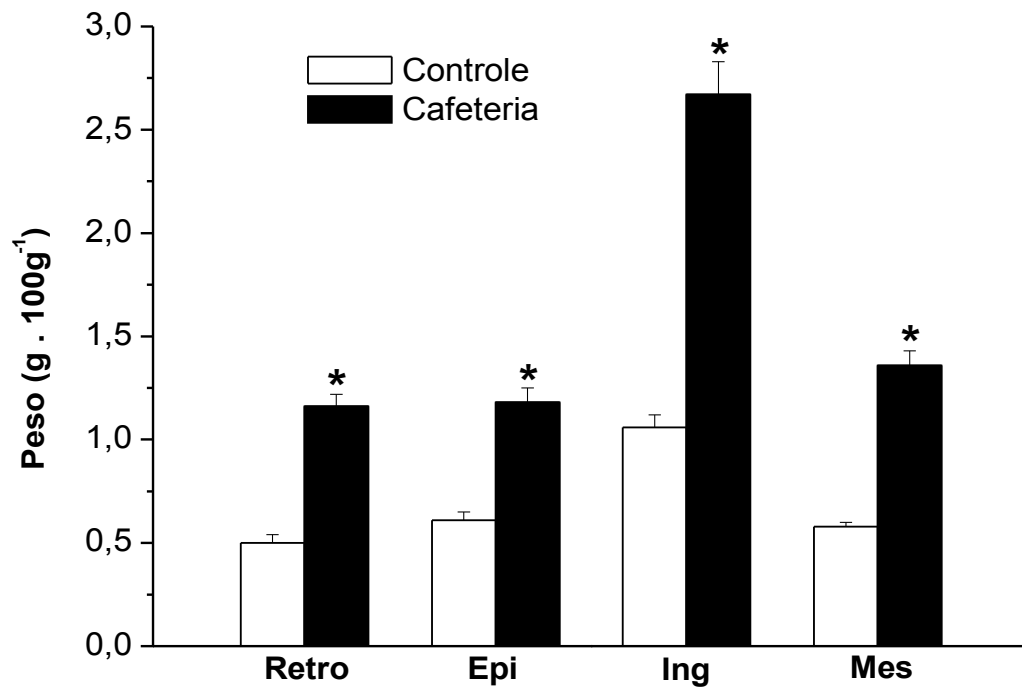


Figura 4. Efeito da dieta cafeteria no peso dos tecido adiposo branco retroperitoneal (Retro), epididimal (Epi), inguinal (Ing) e mesentérico (Mes). Os valores representam a média \pm erro padrão de 6 - 18 animais. * $P < 0,05$ versus controle.

Tabela 5 - Peso do tecido adiposo branco (TAB) epididimal, inguinal, mesentérico e retroperitoneal de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria

	Controle		Cafeteria	
	g	g / 100 g PC	g	g / 100 g PC
TAB Retroperitoneal	1,33 ± 0,11 (18)	0,50 ± 0,04 (18)	3,24 ± 0,24* (18)	1,16 ± 0,06* (18)
TAB Epididimal	1,64 ± 0,12 (16)	0,61 ± 0,04 (17)	3,25 ± 0,22* (17)	1,18 ± 0,07* (17)
TAB Inguinal	2,64 ± 0,22 (6)	1,06 ± 0,06 (6)	6,42 ± 0,39* (6)	2,67 ± 0,16* (6)
TAB Mesentérico	1,43 ± 0,06 (6)	0,58 ± 0,02 (6)	3,24 ± 0,15* (6)	1,36 ± 0,07* (6)

Os valores representam a média ± erro padrão. Os números entre parênteses representam o total de animais utilizados. * $P < 0,05$ vs controle.

4.7 Tecido Adiposo Branco (TAB)

4.7.1 Velocidade de renovação de noradrenalina no TAB

A atividade do sistema nervoso simpático para o TAB retroperitoneal (RETRO) e epididimal (EPI) foi verificada pela medida da velocidade de renovação de noradrenalina após administração de α -metil-éster-tirosina. O declínio na concentração de noradrenalina no TAB RETRO e EPI foi maior nos animais alimentados com a dieta cafeteria quando comparado com os animais controles (Figura 5) indicando um aumento no fluxo simpático para o tecido. Os ratos alimentados com a dieta cafeteria não apresentaram diferença significativa no conteúdo de noradrenalina no tempo 0, mas apresentaram aumento na velocidade de renovação fracional (k) e na velocidade de renovação de noradrenalina (VR) após administração de um inibidor de sua síntese (Tabela 6).

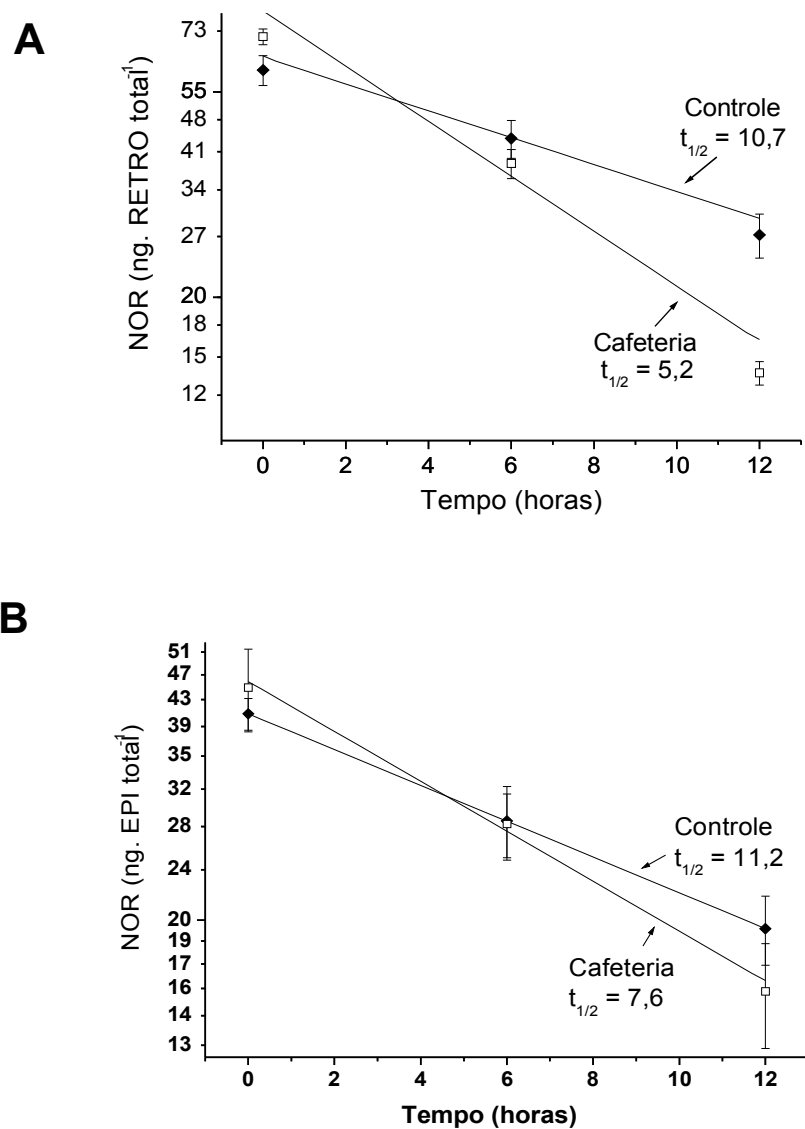


Figura 5: Declínio na concentração de noradrenalina (NOR) no tecido adiposo branco retroperitoneal (A) e epididimal (B) de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria após administração intraperitoneal de α -metil-tirosina. Cada ponto representa média \pm erro padrão de 10 animais.

Tabela 6 - Conteúdo de noradrenalina (NOR), velocidade de renovação fracional (*k*) e velocidade de renovação de noradrenalina (VR) no tecido adiposo branco (TAB) retroperitoneal e epididimal de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria

	NOR (ng)	<i>k</i> (% . h⁻¹)	VR (ng . h⁻¹ .TAB⁻¹)
TAB RETROPERITONEAL			
Controle	61,00 ± 4,40	6,50 ± 0,60	3,90 (3,30 – 4,65)
Cafeteria	71,00 ± 2,70	13,40 ± 0,14 *	9,56 (8,20 – 11,00) *
TAB EPIDIDIMAL			
Controle	41,00 ± 2,24	6,20 ± 0,01	2,54 (2,39 – 2,68)
Cafeteria	45,00 ± 6,38	9,10 ± 0,57 *	4,08 (3,28 – 4,95)*

Os valores representam a média ± erro padrão de 10 animais. **P* < 0,05 vs. controle.

4.7.2 Avaliação da via glicolítica no tecido adiposo branco (TAB)

4.7.2.1 Índice de captação de glicose pelo TAB

O índice de captação de glicose pelo tecido adiposo branco retroperitoneal (RETRO) e epididimal (EPI) foi avaliado em ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria após administração de traços de 2-deoxi-¹⁴C-glicose. Os níveis plasmáticos de glicose dos animais não apresentaram alteração entre os tempos ou grupos analisados e a atividade específica da 2-deoxi-¹⁴C-glicose (DPM . mg de glicose⁻¹) dos animais controles foi similar aos alimentados com a dieta cafeteria (Figura 6). A dieta hipercalórica aumentou o índice de captação de glicose *in vivo* tanto no RETRO quanto no EPI em relação aos animais controles (Tabela 7 e Figura 7).

Tabela 7 - Índice de captação de glicose (ng . mg de tecido⁻¹ . min⁻¹) no TAB retroperitoneal e epididimal de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria

	Controle	Cafeteria
TAB Retroperitoneal	2,16 ± 0,25 (11)	3,28 ± 0,39* (12)
TAB Epididimal	1,80 ± 0,16 (12)	2,72 ± 0,39* (12)

Os valores representam a média ± erro padrão. Os números entre parênteses representam o total de animais utilizados. *P < 0,05 vs controle

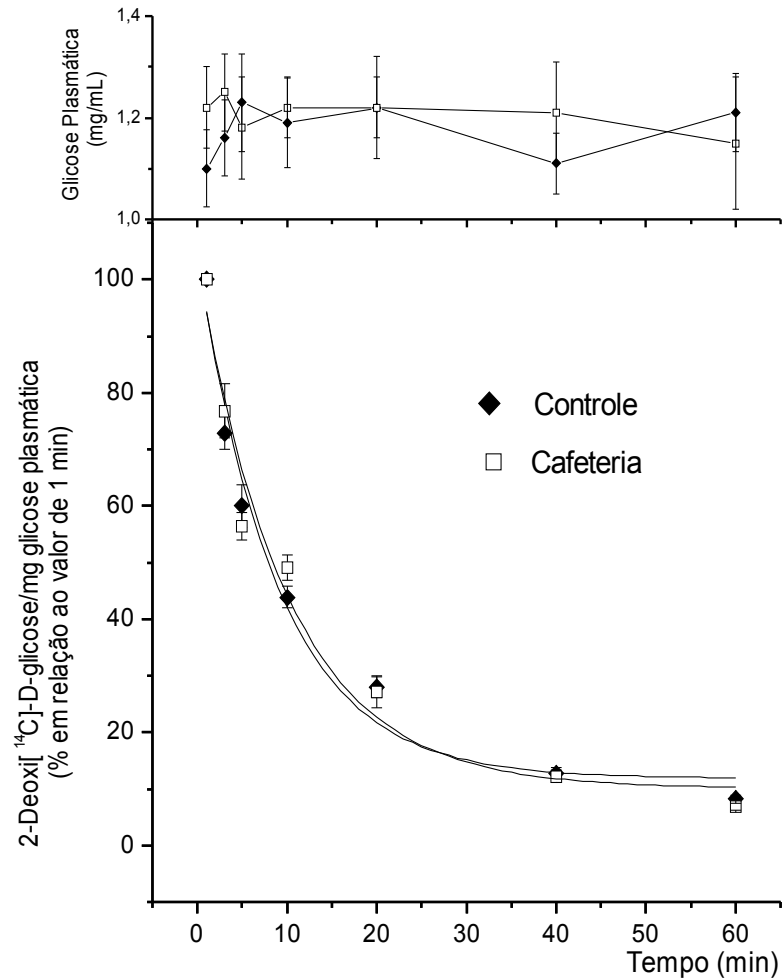


Figura 6. Glicose plasmática e curva temporal da atividade específica da 2-deoxi-¹⁴C-glicose por mg de glicose plasmática (% em relação ao valor de 1 min) em ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria. Cada ponto representa a média \pm erro padrão de 6 animais.

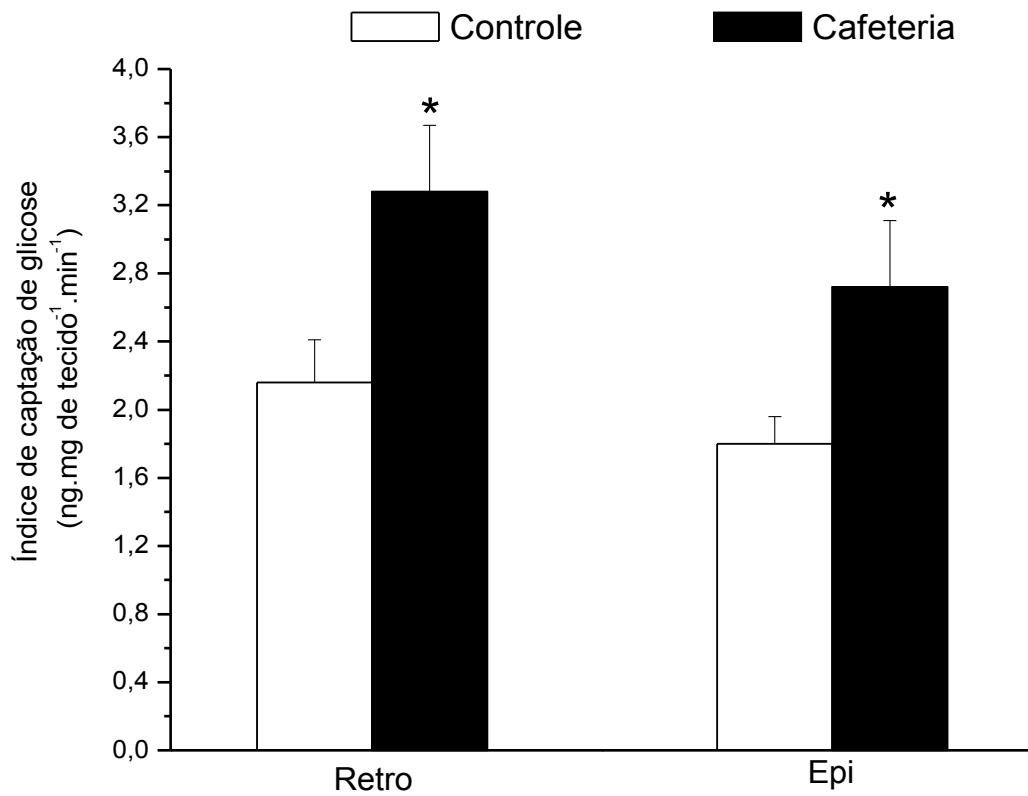


Figura 7. Efeito da dieta cafeteria na captação de glicose *in vivo* pelos tecidos adiposos branco retroperitoneal e epididimal. Os valores representam a média \pm erro padrão de 11 - 12 animais. * $P < 0,05$ versus controle.

4.7.3 Avaliação da via gliceroneogênica no tecido adiposo branco (TAB)

4.7.3.1 Incorporação de 1-[¹⁴C] piruvato na fração glicerol de TAG no TAB

O fluxo da via gliceroneogênica foi avaliado pela velocidade de incorporação de 1-[¹⁴C] piruvato na fração glicerol de triacilglicerol (TAG) em adipócitos dos tecidos adiposos retroperitoneal (RETRO) e epididimal (EPI) nos animais controles e alimentados com a dieta cafeteria (Tabela 8 e Figura 8). Os animais alimentados com a dieta cafeteria apresentaram uma diminuição de aproximadamente 45 e 55% no fluxo gliceroneogênico do RETRO e EPI, respectivamente, em relação aos animais controles.

Tabela 8 - Incorporação 1-[¹⁴C] piruvato em glicerol-TAG (nmol . 10⁶ células⁻¹ . h⁻¹) no TAB retroperitoneal e epididimal de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria

	Controle	Cafeteria
TAB Retroperitoneal	9,89 ± 0,83 (9)	5,47 ± 0,48* (12)
TAB Epididimal	14,95 ± 0,83 (12)	6,66 ± 0,47* (9)

Os valores representam a média ± erro padrão. Os números entre parênteses representam o total de animais utilizados. **P* < 0,05 vs controle.

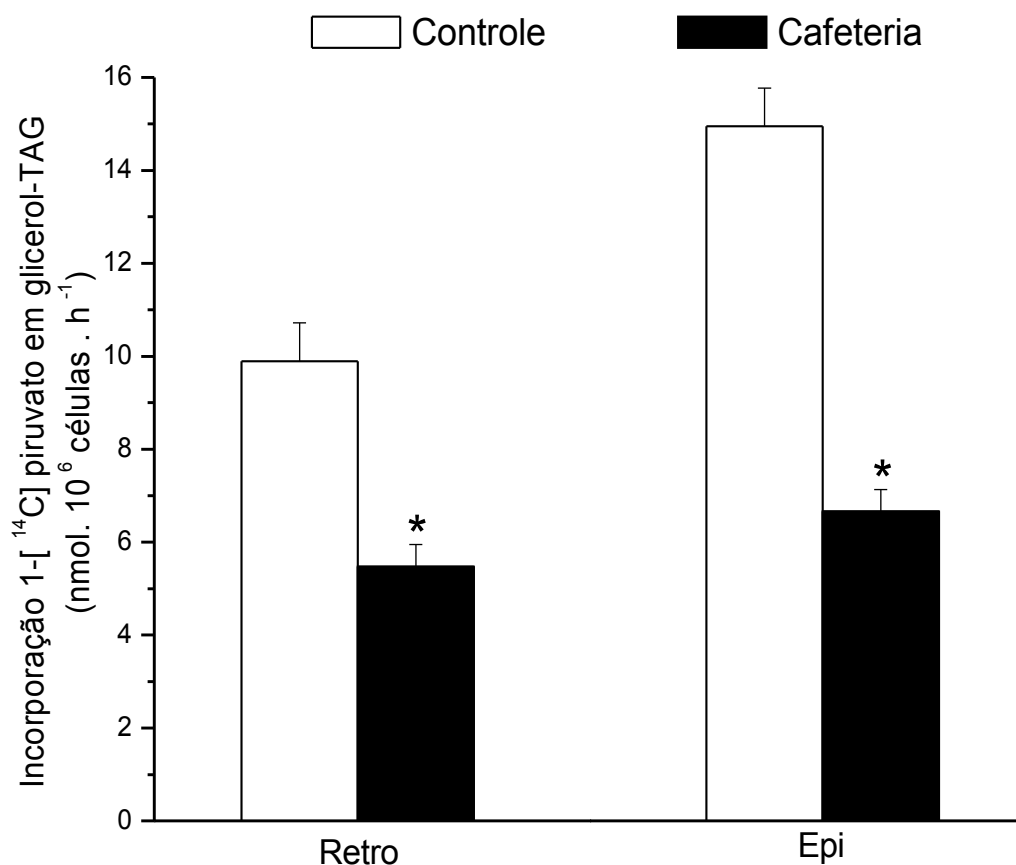


Figura 8. Efeito da dieta cafeteria na incorporação de 1-¹⁴C piruvato em glicerol de triacilglicerol (TAG) em células isoladas dos tecidos adiposos branco retroperitoneal e epididimal. Os valores representam a média ± erro padrão de 9 – 12 animais. *P < 0,05 versus controle.

4.7.3.2 Atividade da PEPCK

A atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), enzima chave da gliceroneogênese, foi determinada no TAB retroperitoneal e epididimal de animais controles e alimentados com a dieta cafeteria (Tabela 9 e Figura 9). Os animais alimentados com a dieta cafeteria apresentaram uma diminuição na atividade da PEPCK de aproximadamente 40 e 35% no TAB retroperitoneal e epididimal, respectivamente, em relação aos animais controles.

Tabela 9 - Atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase ($\text{nmol} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) no tecido adiposo branco (TAB) retroperitoneal e epididimal de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria

	Controle	Cafeteria
TAB Retroperitoneal	3,69 \pm 0,28 (24)	2,19 \pm 0,21* (21)
TAB Epididimal	2,96 \pm 0,22 (11)	1,89 \pm 0,19* (10)

Os valores representam a média \pm erro padrão. Os n\u00fameros entre par\u00eanteses representam o total de animais utilizados. * $P < 0,05$ vs controle.

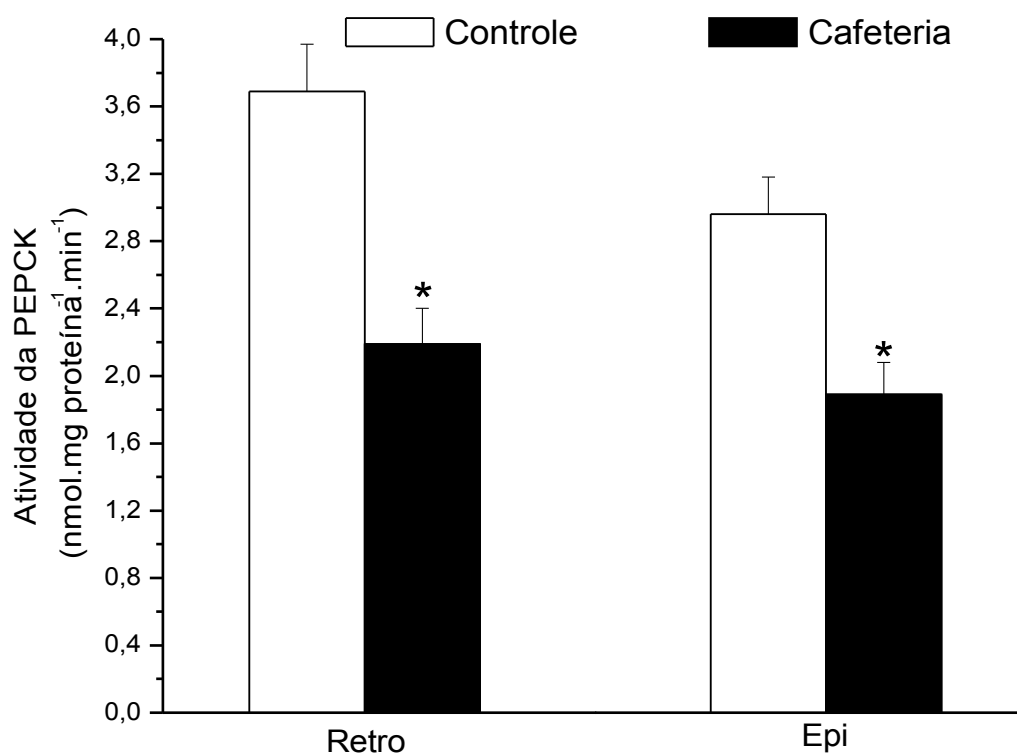


Figura 9. Efeito da dieta cafeteria na atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) dos tecidos adiposos branco retroperitoneal e epididimal. Os valores representam a média \pm erro padrão de 10 - 24 animais. * $P < 0,05$ versus controle.

4.7.4 Avaliação do processo de fosforilação direta do glicerol no tecido adiposo branco (TAB)

4.7.4.1 Velocidade de incorporação de glicerol-U-¹⁴C na fração glicerol de TAG pelo TAB

O processo de fosforilação direta do glicerol foi avaliado pela velocidade de incorporação de glicerol-U-¹⁴C na fração glicerol de triacilglicerol (TAG) em adipócitos isolados do TAB retroperitoneal e epididimal em animais controles e alimentados com a dieta cafeteria (Tabela 10 e Figura 10). Os animais alimentados com a dieta cafeteria apresentaram um aumento de aproximadamente 55 e 70% no fluxo do processo de fosforilação direta do glicerol no TAB retroperitoneal e epididimal, respectivamente, em relação aos animais controles.

Tabela 10 - Incorporação de glicerol-U-¹⁴C em glicerol-TAG (nmol . 10⁶ células⁻¹ .h⁻¹) no TAB retroperitoneal e epididimal de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria

	Controle	Cafeteria
TAB Retroperitoneal	5,06 ± 0,29 (7)	7,89 ± 1,00* (5)
TAB Epididimal	14,70 ± 0,88 (6)	25,10 ± 3,11* (6)

Os valores representam a média ± erro padrão. Os números entre parênteses representam o total de animais utilizados. **P* < 0,05 vs controle.

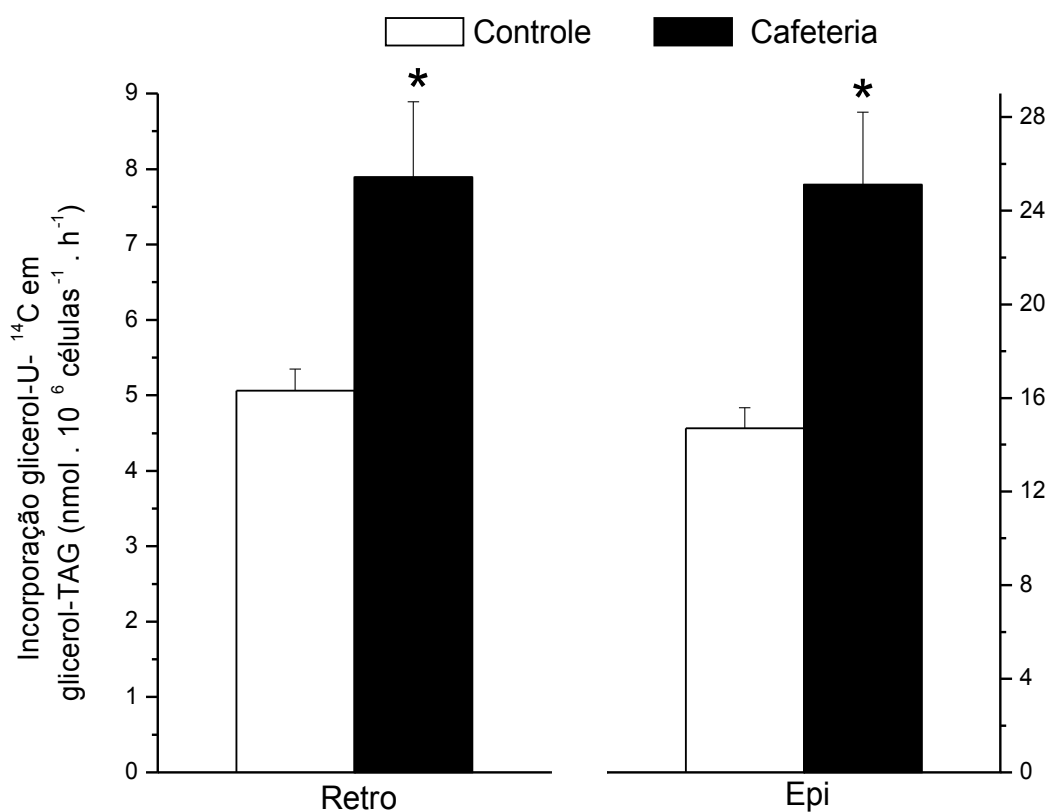


Figura 10. Efeito da dieta cafeteria na incorporação de glicerol-U-¹⁴C em glicerol de triacilglicerol em células isoladas dos tecidos adiposos branco retroperitoneal e epididimal. Os valores representam a média ± erro padrão de 9 – 12 animais. *P < 0,05 versus controle.

4.7.4.2 Atividade da gliceroquinase

A atividade da gliceroquinase foi determinada no TAB retroperitoneal e epididimal de animais controles e alimentados com a dieta cafeteria (Tabela 11 e Figura 11). Os animais alimentados com a dieta cafeteria apresentaram um aumento de aproximadamente 120 e 35% na atividade enzimática da gliceroquinase no TAB retroperitoneal e epididimal em relação aos animais controles.

Tabela 11 - Atividade da gliceroquinase (nmol . mg proteína⁻¹. min⁻¹) no TAB retroperitoneal e epididimal de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria

	Controle	Cafeteria
TAB Retroperitoneal	0,68 ± 0,08 (5)	1,49 ± 0,10* (5)
TAB Epididimal	1,09 ± 0,11 (6)	1,48 ± 0,13* (6)

Os valores representam a média ± erro padrão. Os números entre parênteses representam o total de animais utilizados. **P* < 0,05 vs controle.

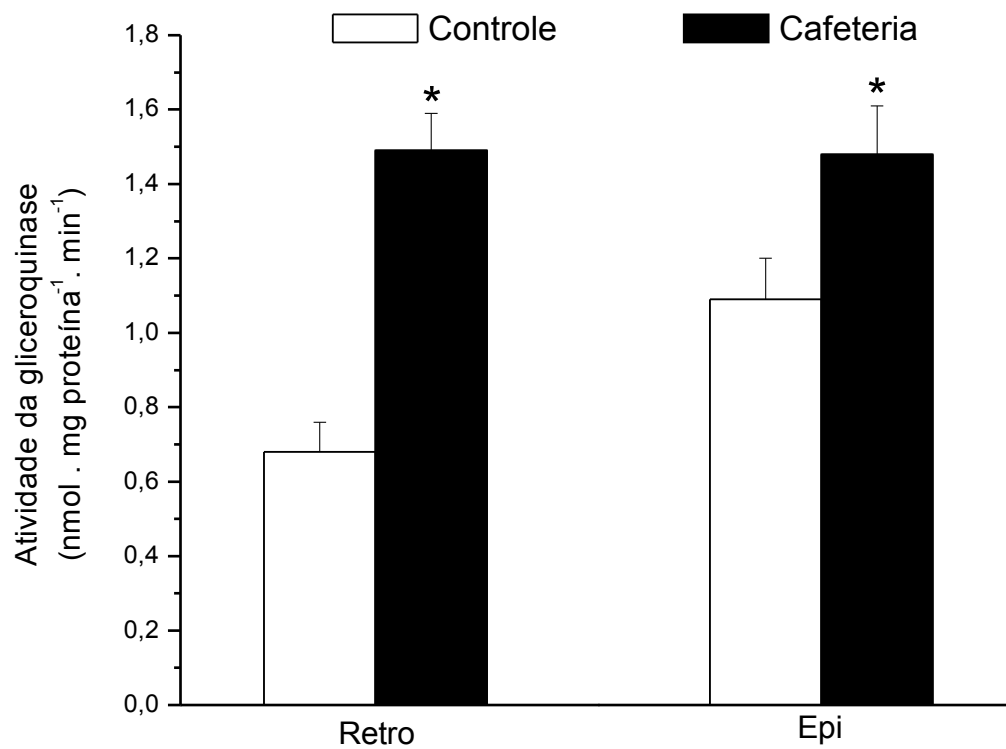


Figura 11. Efeito da dieta cafeteria na atividade da gliceroquinase dos tecidos adiposos branco retroperitoneal e epididimal. Os valores representam a média \pm erro padrão de 5 - 6 animais. * $P < 0,05$ versus controle.

4.7.5 Síntese *de novo* de ácido graxo *in vivo*

A síntese de ácidos graxos *de novo* foi avaliada no TAB retroperitoneal e epididimal de ratos alimentados com a dieta cafeteria e controles através da administração de $^3\text{H}_2\text{O}$ (Tabela 12 e Figura 12). Os animais alimentados com a dieta cafeteria apresentaram um aumento significativo na síntese de ácido graxo *de novo* tanto no TAB retroperitoneal quanto no epididimal em relação aos animais controles

Tabela 12 - Ácido graxo sintetizado *de novo* ($\text{nmol} \cdot \text{g tecido}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) no tecido adiposo branco (TAB) retroperitoneal e epididimal de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria

	Controle	Cafeteria
TAB Retroperitoneal	51,8 ± 12,5 (10)	102,5 ± 14,1* (10)
TAB Epididimal	72,5 ± 6,4 (5)	114,7 ± 1,9* (5)

Os valores representam a média ± erro padrão. Os números entre parênteses representam o total de animais utilizados. *P < 0,05 vs controle.

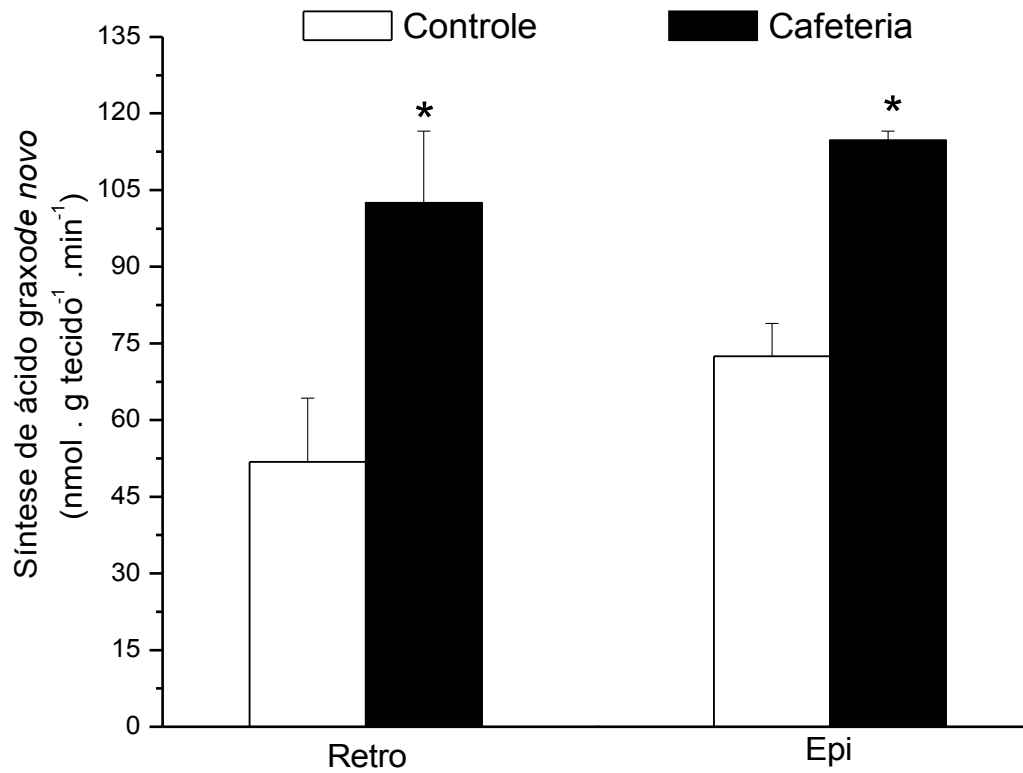


Figura 12. Efeito da dieta cafeteria na síntese *de novo* de ácidos graxos *in vivo* pelos tecidos adiposos branco retroperitoneal e epididimal. Os valores representam a média \pm erro padrão de 5 – 10 animais. * $P < 0,05$ versus controle.

4.7.6 Atividade da lipase lipoprotéica

A lipase lipoprotéica está presente no endotélio capilar e realiza a hidrólise de triacilglicerol das lipoproteínas circulantes em ácidos graxos e glicerol. Após hidrólise, os ácidos graxos podem ser captados pelos adipócitos e incorporados em triacilglicerol. A dieta cafeteria induziu uma elevação na atividade da lipase lipoprotéica do TAB retroperitoneal e epididimal (Tabela 13 e Figura 13).

Tabela 13 - Atividade da lipase lipoprotéica (nmol de ácido oléico liberado . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹) no tecido adiposo branco retroperitoneal e epididimal de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria

	Controle	Cafeteria
TAB Retroperitoneal	22,70 ± 0,99	28,10 ± 1,90*
TAB Epididimal	24,00 ± 0,93	27,70 ± 0,88*

Os valores representam a média ± erro padrão de 18 animais. **P* < 0,05 vs controle.

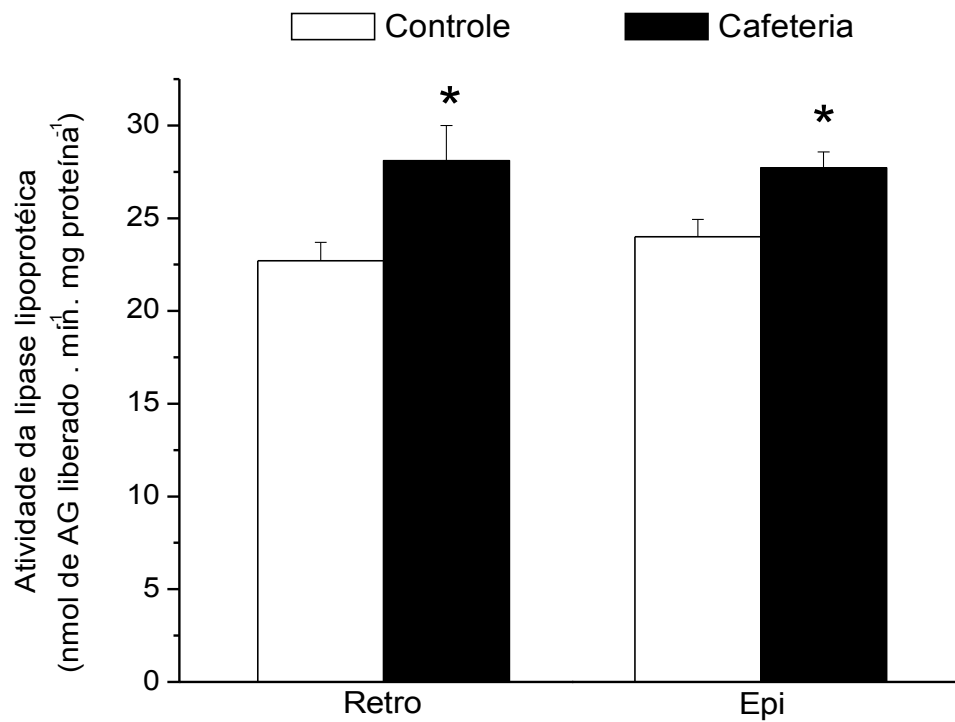


Figura 13: Efeito da dieta cafeteria na atividade da lipase lipoprotéica no tecido adiposo branco (TAB) retroperitoneal e epididimal. Os valores representam a média \pm erro padrão de 18 animais. * $P < 0,05$ versus controle

4.8 Efeito da desnervação simpática cirúrgica unilateral do TAB retroperitoneal

Nesta seção, todos os resultados obtidos após desnervação simpática cirúrgica do TAB retroperitoneal dos ratos controles alimentados com a dieta comercial foram transcritos da dissertação de mestrado desenvolvida por Frasson & Migliorini (2005).

4.8.1 Avaliação da via glicolítica pelo TAB retroperitoneal

4.8.1.1 Índice de captação de glicose

O índice de captação de glicose pelo tecido adiposo branco retroperitoneal (RETRO) inervado e desnervado foi avaliado em ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria após administração de traços de 2-deoxi-¹⁴C-glicose. A desnervação causou uma elevação no índice de captação de glicose *in vivo* pelo TAB RETRO dos ratos controles, mas não promoveu alteração nesse índice nos animais alimentados com a dieta cafeteria (Tabela 14 e Figura 14).

Tabela 14 - Índice de captação de glicose ($\text{ng} \cdot \text{mg de tecido}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) no tecido adiposo branco retroperitoneal inervado e desnervado de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria

	Inervado	Desnervado
Controle	2,60 ± 0,30	3,62 ± 0,34*
Cafeteria	4,32 ± 0,54*	4,98 ± 0,36*

Os valores representam a média ± erro padrão de 6 animais. * $P < 0,05$ vs controle inervado.

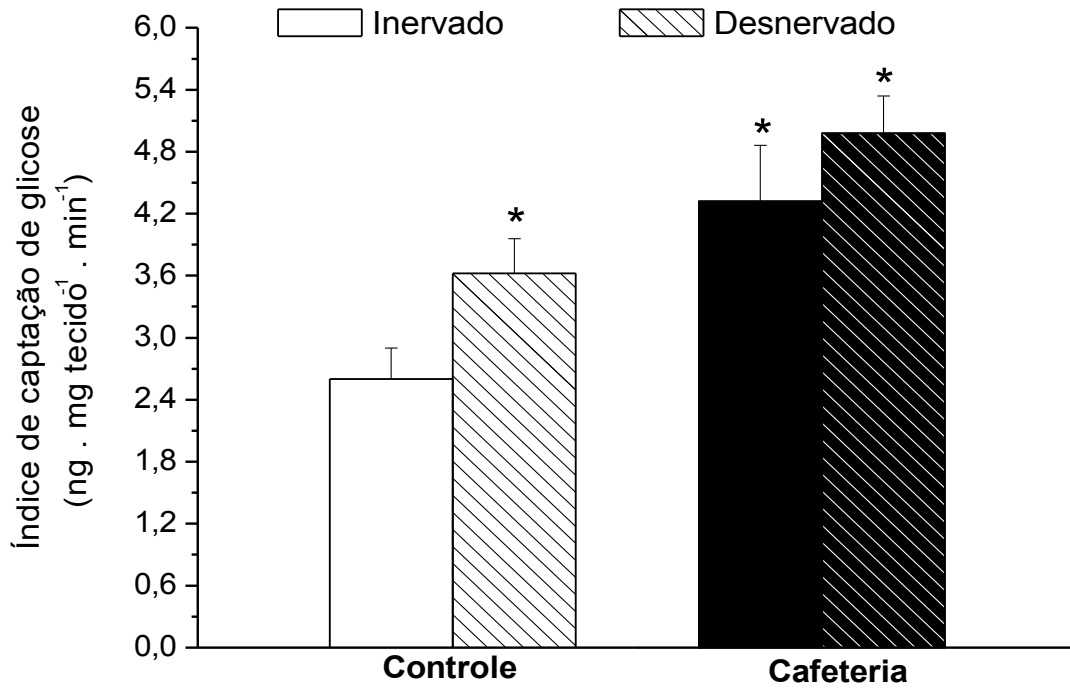


Figura 14. Efeito da desnervação simpática cirúrgica unilateral do tecido adiposo branco retroperitoneal no índice de captação de glicose *in vivo* de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria. Os valores representam a média \pm erro padrão de 6 animais. * $P < 0,05$ versus controle inervado.

4.8.2 Avaliação da via gliceroneogênica no TAB retroperitoneal

4.8.2.1 Incorporação de 1-¹⁴C piruvato na fração glicerol de TAG no TAB retroperitoneal

O fluxo gliceroneogênico foi avaliado pela velocidade de incorporação de 1-[¹⁴C] piruvato em glicerol de TAG no tecido adiposo branco retroperitoneal (RETRO) inervado e desnervado de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria. A desnervação induziu uma redução na incorporação de 1-¹⁴C piruvato em glicerol de TAG pelo TAB RETRO dos ratos controles, mas não promoveu alteração nesse parâmetro nos alimentados com a dieta cafeteria (Tabela 15 e Figura 15).

Tabela 15 - Incorporação 1-¹⁴C piruvato em glicerol-TAG (nmol . 10⁶ células⁻¹ . h⁻¹) no tecido adiposo branco retroperitoneal inervado e desnervado de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria

	Inervado	Desnervado
Controle	11,12 ± 1,96	4,66 ± 0,36*
Cafeteria	4,52 ± 0,37*	4,00 ± 0,45*

Os valores representam a média ± erro padrão de 6 animais. **P* < 0,05 vs controle inervado.

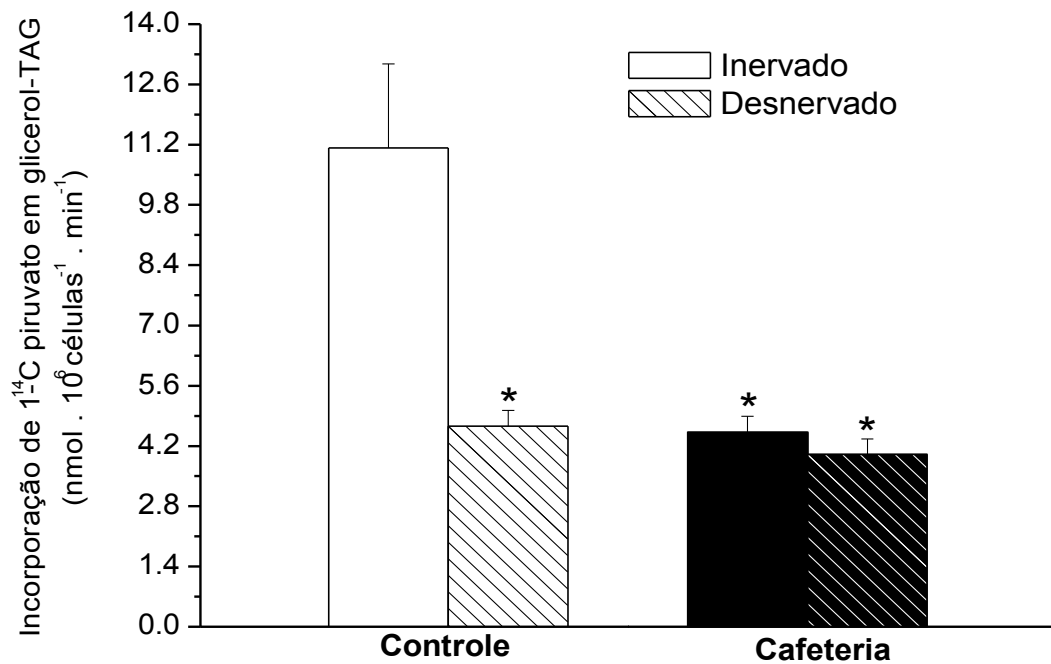


Figura 15. Efeito da desnervação simpática cirúrgica unilateral do tecido adiposo branco retroperitoneal na velocidade de incorporação de $1\text{-}^{14}\text{C}$ piruvato em glicerol de triacilglicerol em ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria. Os valores representam a média \pm erro padrão de 6 animais. $*P < 0,05$ versus controle inervado.

4.8.2.2 Atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase no TAB retroperitoneal

A atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), enzima chave da gliconeogênese, foi avaliada no tecido adiposo branco retroperitoneal (RETRO) inervado e desnervado de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria. A desnervação promoveu uma redução na atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) do TAB RETRO dos ratos controles, mas não induziu alteração desse parâmetro nos animais alimentados com a dieta cafeteria (Tabela 16 e Figura 16).

Tabela 16 - Atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase ($\text{nmol.mg prote\u00edna}^{-1}.\text{min}^{-1}$) no tecido adiposo branco retroperitoneal inervado e desnervado de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria

	Inervado	Desnervado
Controle	$2,32 \pm 1,96$	$1,51 \pm 0,36^*$
Cafeteria	$1,35 \pm 0,09^*$	$1,47 \pm 0,09^*$

Os valores representam a média \pm erro padrão de 10 animais. $^*P < 0,05$ vs controle inervado.

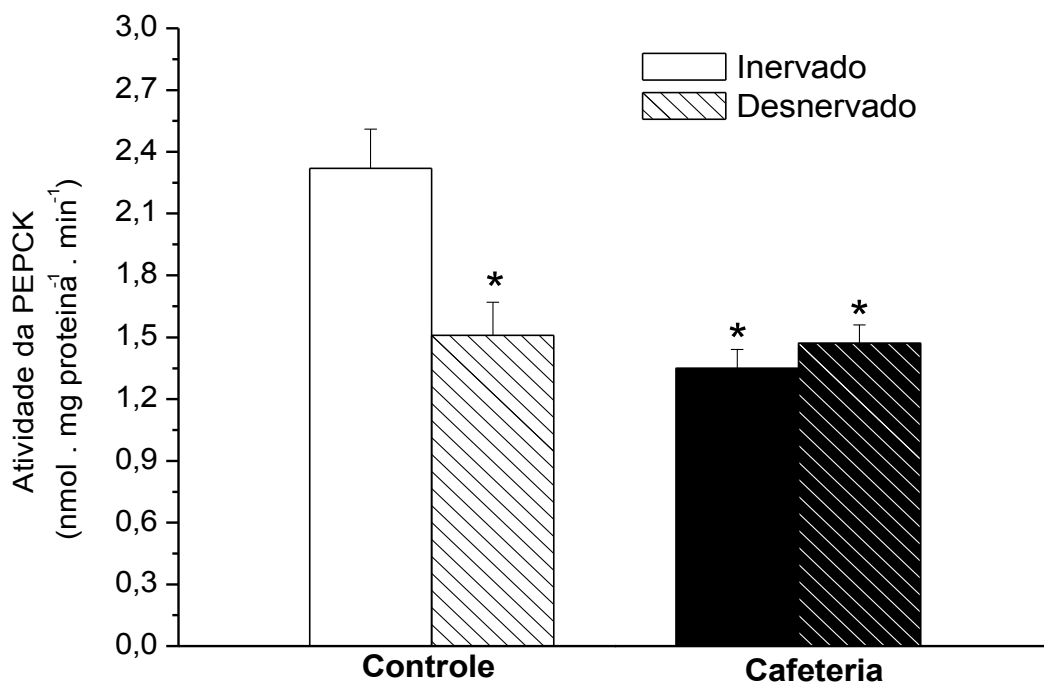


Figura 16. Efeito da desnervação simpática cirúrgica unilateral do tecido adiposo branco retroperitoneal na atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria. Os valores representam a média \pm erro padrão de 10 animais. * $P < 0,05$ versus controle inervado.

4.8.3 Avaliação do processo de fosforilação direta do glicerol no TAB

4.8.3.1 Atividade da gliceroquinase

A atividade da gliceroquinase (GK) foi avaliada no tecido adiposo branco retroperitoneal (RETRO) inervado e desnervado de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria. A desnervação promoveu uma diminuição significativa na atividade da GK do TAB RETRO dos animais controles e alimentados com a dieta cafeteria (Tabela 17 e Figura 17).

Tabela 17 - Atividade da gliceroquinase ($\text{nmol} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) no tecido adiposo branco retroperitoneal inervado e desnervado de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria

	Inervado	Desnervado
Controle	$0,87 \pm 0,06$	$0,55 \pm 0,03^*$
Cafeteria	$1,84 \pm 0,22^{**}$	$1,06 \pm 0,09^*$

Os valores representam a média \pm erro padrão de 10 animais. $^*P < 0,05$ vs tecido contralateral inervado. $^{**}P < 0,05$ vs controle.

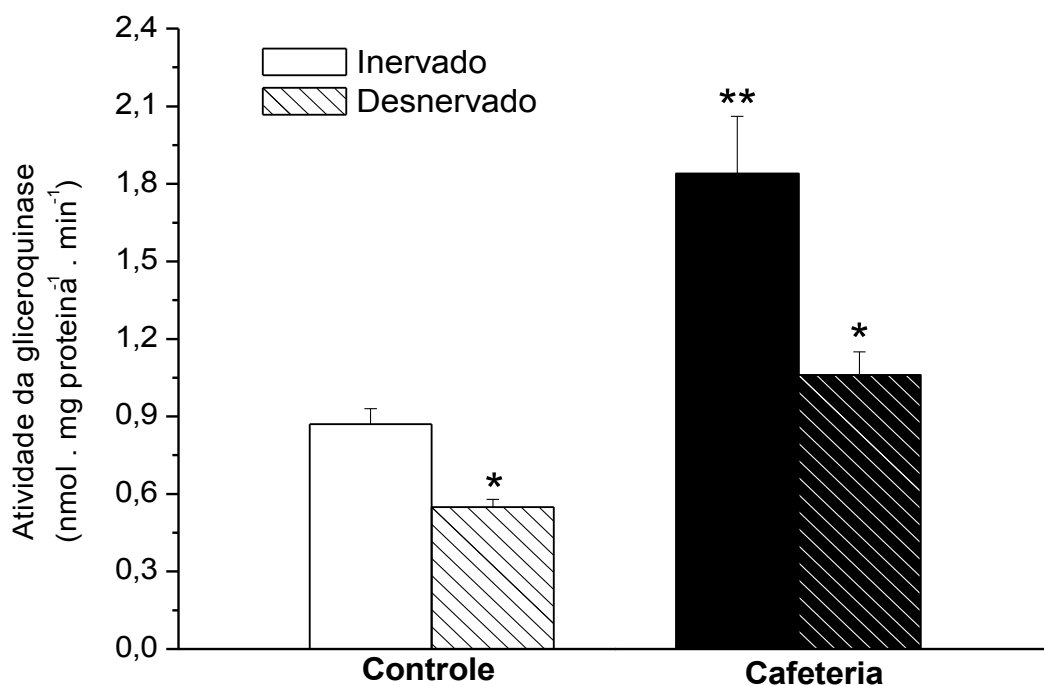


Figura 17. Efeito da desnervação simpática cirúrgica unilateral do tecido adiposo branco retroperitoneal na atividade da gliceroquinase de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria. Os valores representam a média \pm erro padrão de 6 animais. * $P < 0,05$ versus o tecido contralateral inervado; ** $P < 0,05$ versus controle.

4.9 Tecido Adiposo Marron

4.9.1 Peso e conteúdo de lipídios totais e de proteínas totais e mitocondriais do TAMI de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria

O peso do TAMI e o conteúdo de lipídios totais e de proteínas totais e mitocondriais do tecido foram avaliados nos animais controles e alimentados com a dieta cafeteria (Tabela 18). Os animais alimentados com a dieta cafeteria apresentaram um aumento de aproximadamente 100, 220, 66 e 24% no peso do TAMI, no conteúdo de lipídios totais e de proteínas totais e mitocondriais, respectivamente.

Tabela 18 - Peso do tecido adiposo marrom interescapular (TAMI) e conteúdo de lipídios totais, proteínas totais e mitocondriais do TAMI de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria

	Controle	Cafeteria
TAMI (mg)	207,00 ± 10,00 (6)	415,00 ± 24,00* (6)
Lipídios Totais (mg)	73,88 ± 11,57 (6)	237,63 ± 28,47 (6)*
Proteína Total (mg)	10,90 ± 0,50 (6)	18,10 ± 0,70* (6)
Proteína Mitocondrial (mg)	1,70 ± 0,10 (6)	2,10 ± 0,10* (6)

Os valores representam a média ± erro padrão. Os números entre parênteses representam o total de animais utilizados. * $P < 0,05$ vs controle.

4.9.2 Avaliação da capacidade termogênica do tecido adiposo marrom interescapular (TAMI) de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria

4.9.2.1 Velocidade de renovação de noradrenalina no TAMI

A atividade do tecido adiposo marrom interescapular (TAMI) é controlada diretamente pelo sistema nervoso simpático (SNS), desta forma a avaliação da atividade simpática do tecido é um reflexo do seu estado funcional. A atividade do SNS em determinado tecido pode ser avaliada pela velocidade de renovação de noradrenalina, sendo que quanto maior o estado funcional do tecido menor será o conteúdo de noradrenalina após administração de um inibidor da sua síntese. A α -metil-éster-tirosina, um inibidor da tirosina hidroxilase, foi utilizada como bloqueador da síntese da noradrenalina.

O declínio na concentração de noradrenalina foi avaliado no TAMI de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria (Figura 18). A dieta cafeteria promoveu uma diminuição na vida média da noradrenalina no TAMI. Os ratos alimentados com a dieta cafeteria não apresentaram diferença significativa no conteúdo de noradrenalina no tempo 0, mas apresentaram aumento na velocidade de renovação fracional (k) e na velocidade de renovação de noradrenalina (VR) após administração de α -metil-éster-tirosina (Tabela 19).

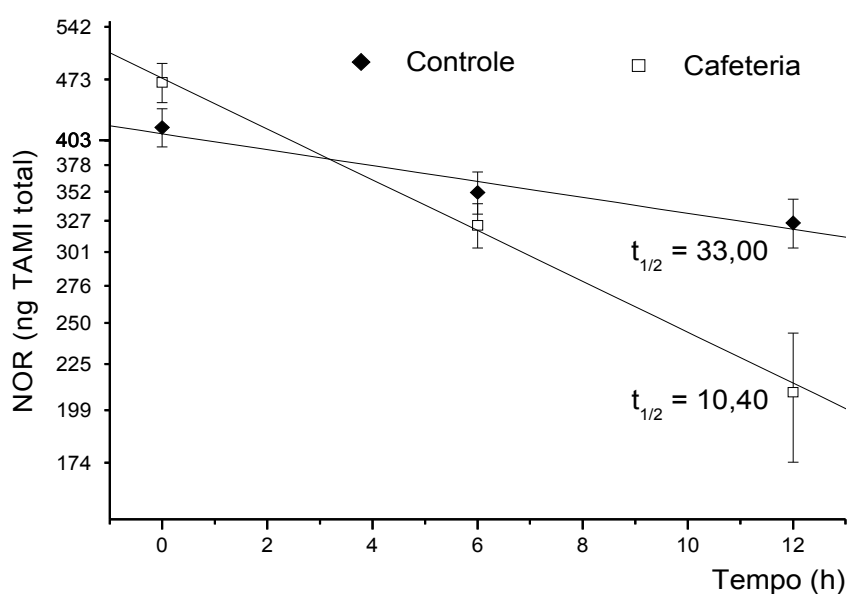


Figura 18. Declínio na concentração de noradrenalina no tecido adiposo marrom interescapular de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria após administração intraperitoneal de α -metil-tirosina. Cada ponto representa a média \pm erro padrão de 10 animais. Valor de R: Controle: 0,977 Cafeteria: 0,998.

Tabela 19 - Conteúdo de noradrenalina (NOR), velocidade de renovação fracional (k) e a velocidade de renovação de noradrenalina (VR) no TAMI de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria

	NOR (ng)	k (% . h⁻¹)	VR (ng . h⁻¹ .TAMI⁻¹)
Controle	417 ± 21	2,10 ± 0,45	8,70 (6,53 – 11,17)
Cafeteria	469 ± 24	6,63 ± 0,37*	31,10 (27,83 – 34,53)*

Os valores representam a média ± erro padrão de 10 animais. * $P < 0,05$ vs. controle.

4.9.2.2 Ligação de GDP à proteína desacopladora (UCP-1) do tecido adiposo marrom interescapular (TAMI)

A capacidade termogênica do TAMI também pode ser avaliada, em mitocôndrias isoladas, pela ligação de GDP a sítios de afinidade a nucleotídeos purínicos localizados na proteína desacopladora UCP-1. Quanto maior o estado funcional do TAMI maior a ligação de GDP à proteína UCP-1, porque maior número de sítios da proteína UCP-1 estarão expostos na matrix mitocondrial.

Os animais alimentados com a dieta cafeteria apresentaram um aumento de aproximadamente 40% na capacidade de ligação de GDP à UCP-1 em mitocôndrias isoladas do TAMI quanto comparado aos animais controles (Tabela 20 e Figura 19).

Tabela 20 - Ligação de ^3H -GDP à proteína UCP-1 de mitocôndrias isoladas do TAMI de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria

	Controle	Cafeteria
Ligação de ^3H -GDP (pmol. mg proteína mitocondrial $^{-1}$)	148 ± 9	209 ± 12*

Os valores representam a média ± erro padrão de 6 animais e representa um experimento que foi repetido 3 vezes. * $P < 0,05$ vs. controle.

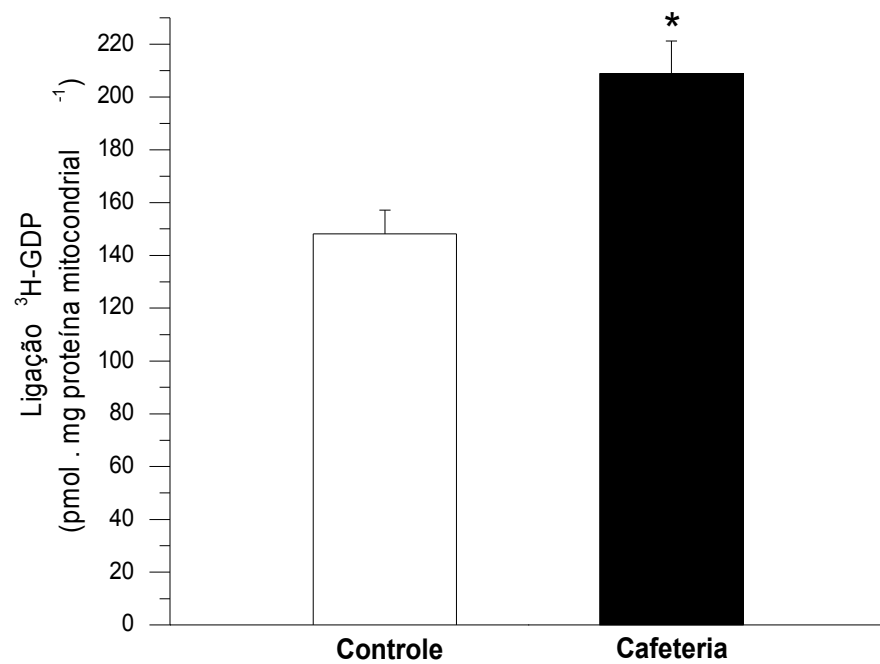


Figura 19. Efeito da dieta cafeteria na ligação mitocondrial de GDP do tecido adiposo marrom interescapular. Os valores representam a média \pm erro padrão de 6 animais. * $P < 0,05$ versus controle.

4.9.2.3 Conteúdo de UCP-1

A presença da proteína desacopladora-1 (UCP-1) na membrana mitocondrial interna do tecido adiposo marrom (TAM) torna o tecido capaz de desvincular o sistema de transporte de prótons da síntese de ATP, exercendo sua função termogênica. A determinação do conteúdo de UCP-1 do TAM pode ser utilizada para avaliar a atividade termogênica do tecido. Quanto maior o conteúdo de UCP-1 na membrana interna mitocondrial, maior a capacidade do TAM em desacoplar a fosforilação oxidativa.

O conteúdo de UCP-1 foi avaliado no TAM de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria (Figura 20). Os animais alimentados com a dieta cafeteria apresentaram um aumento de aproximadamente 35% no conteúdo de UCP-1 no TAM quanto comparado aos animais controles.

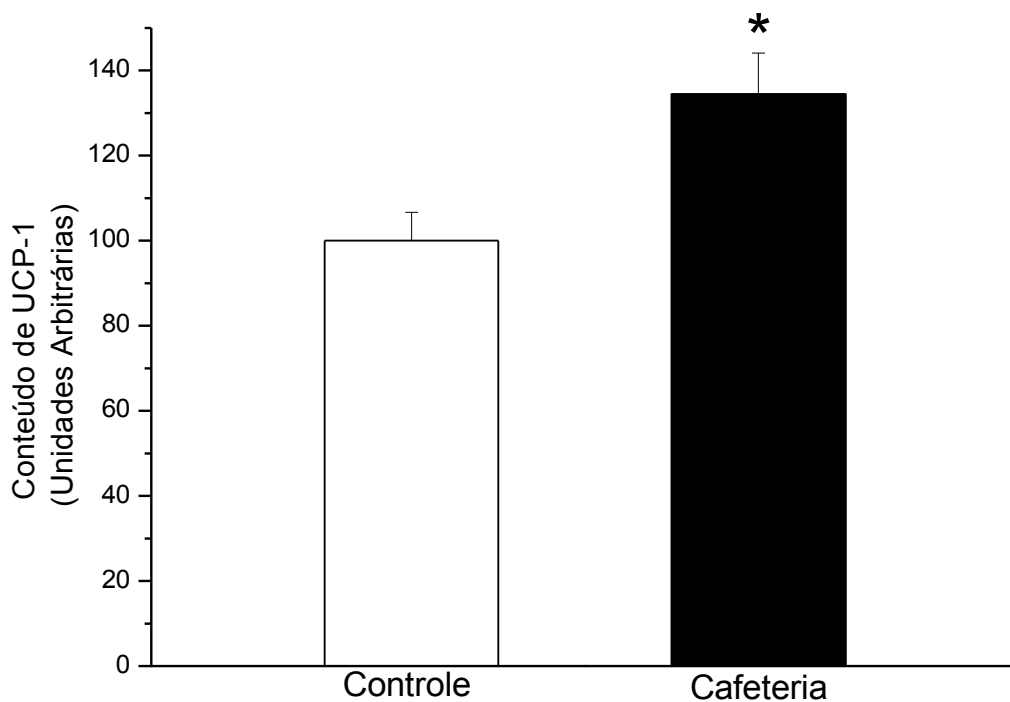


Figura 20. Efeito da dieta cafeteria no conteúdo da proteína UCP-1 no TAMI. Os valores representam a média \pm erro padrão de 4 animais. * $P < 0,05$ versus controle. Western blot representativo da UCP-1 no TAMI (**A**). O termo unidades arbitrárias refere-se ao valor densitométrico da banda referente a UCP-1 na membrana corrigido pelo valor densitométrico total referente às proteínas mitocondriais no gel replica para a mesma amostra.

4.9.3 Avaliação da via glicolítica no tecido adiposo marrom interescapular (TAMI)

4.9.3.1 Índice de captação de glicose pelo TAMI

Um método utilizado para estudar a regulação da via glicolítica é pela estimativa da utilização de glicose *in vivo* pelo tecido, utilizando 2-desoxi-¹⁴C-glicose. O emprego desta técnica se baseia no fato da glicose e da 2-desoxi-¹⁴C-glicose utilizarem o mesmo transportador e ambos serem igualmente sensíveis à ação da hexoquinase. No entanto, a 2-desoxiglicose fosfato se acumula no tecido por não sofrer ação das enzimas subseqüentes da via glicolítica.

O índice de captação de glicose foi avaliado em ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria submetidos à desnervação unilateral simpática cirúrgica do TAMI após administração de traços de 2-deoxi-¹⁴C-glicose. Os níveis plasmáticos de glicose dos animais não apresentaram alteração entre os tempos ou grupos analisados. A atividade específica da 2-deoxi-¹⁴C-glicose (DPM . mg de glicose⁻¹) dos animais controles foi similar aos alimentados com a dieta cafeteria (Figura 6). A dieta cafeteria aumentou o índice de captação de glicose *in vivo* pelo TAMI. A desnervação unilateral simpática cirúrgica do tecido provocou uma diminuição na captação de glicose pelo TAMI nos animais controles, mas não induziu alteração neste índice nos animais alimentados com a dieta cafeteria (Tabela 21 e Figura 21).

Tabela 21 - Índice de captação de glicose ($\text{ng.mg de tecido}^{-1}.\text{min}^{-1}$) no TAMI de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria

	Inervado	Desnervado
Controle	$2,38 \pm 0,29$ (15)	$1,25 \pm 0,28^{\#}$ (8)
Cafeteria	$3,84 \pm 0,47^*$ (15)	$3,74 \pm 0,69^*$ (9)

Os valores representam a média \pm erro padrão. Os números entre parênteses representam o total de animais utilizados. * $P < 0,05$ vs controle. # $P < 0,05$ vs controle inervado.

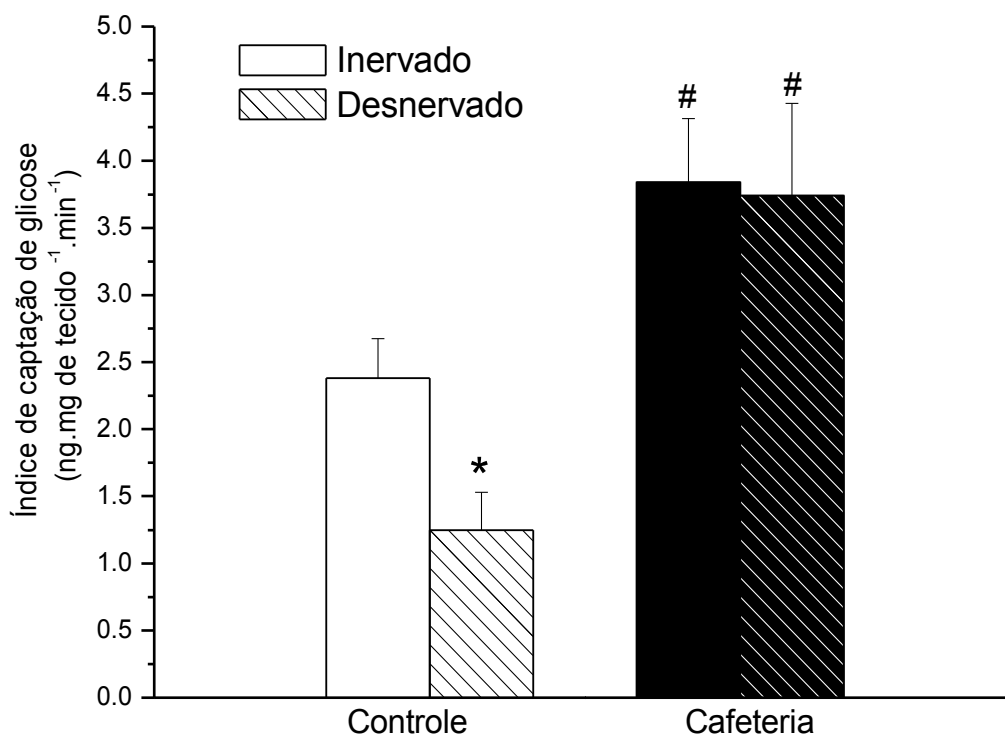


Figura 21. Efeito da desnervação simpática unilateral do tecido adiposo marrom na captação de glicose pelo tecido em ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria. Os valores representam a média \pm erro padrão de 8 - 15 animais. * $P < 0,05$ versus controle inervado, # $P < 0,05$ versus controles.

4.9.4 Avaliação da via gliceroneogênica no tecido adiposo marrom interescapular (TAMI)

4.9.4.1 Incorporação de 1-¹⁴C piruvato na fração glicerol de TAG no TAMI

O fluxo na via gliceroneogênica foi determinado pela incorporação de 1-¹⁴C piruvato na fração glicerol de TAG em fragmentos de TAMI previamente hemidesnervado de animais controles e alimentados com a dieta cafeteria (Tabela 22 e Figura 22). Os animais alimentados com a dieta cafeteria apresentaram uma diminuição de aproximadamente 60% no fluxo gliceroneogênico no TAMI em relação aos animais controles. A desnervação simpática unilateral cirúrgica não promoveu alteração na via gliceroneogênica tanto nos animais alimentados com a dieta cafeteria quanto nos animais controles.

Tabela 22 – Velocidade de incorporação 1-¹⁴C piruvato em glicerol-TAG (nmol . g TAMI⁻¹ . 2h⁻¹) em fragmentos do TAMI de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria

	Inervado	Desnervado
Controle	5,13 ± 0,51 (11)	5,65 ± 0,50 (7)
Cafeteria	2,16 ± 0,21* (11)	2,21 ± 0,13* (6)

Os valores representam a média ± erro padrão. Os números entre parênteses representam o total de animais utilizados. **P* < 0,05 vs controle.

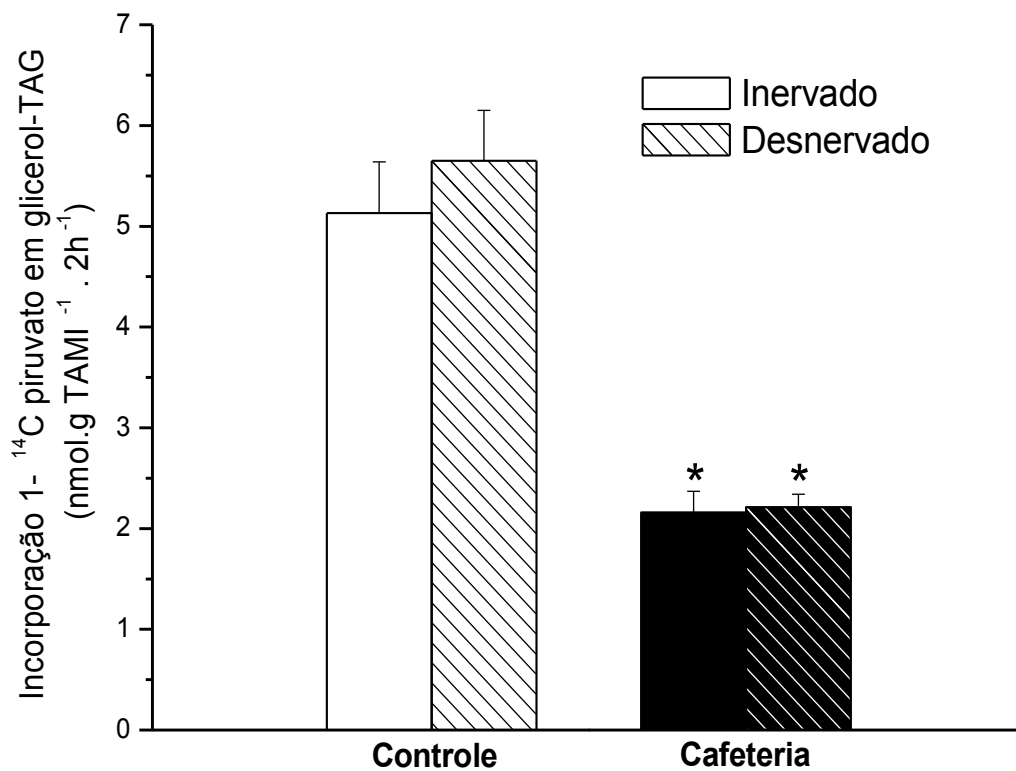


Figura 22. Efeito da desnervação simpática unilateral na incorporação de 1-¹⁴C piruvato em glicerol de triacilglicerol nos fragmentos de tecido adiposo marrom em ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria. Os valores representam a média \pm erro padrão de 6 – 8 animais. * $P < 0,05$ vs controle.

4.9.4.2 Atividade da PEPCK

A atividade da fosfoeno/piruvato carboxiquinase (PEPCK), enzima chave da gliceroneogênese, foi determinada no TAMI previamente hemidesnervado de animais controles e alimentados com a dieta cafeteria (Tabela 23 e Figura 23). Os animais alimentados com a dieta cafeteria apresentaram uma diminuição de aproximadamente 60% na atividade da PEPCK em relação aos animais controles. A desnervação simpática unilateral cirúrgica não induziu alteração na atividade da enzima chave gliceroneogênese tanto nos animais alimentados com a dieta cafeteria quanto nos animais controles.

Tabela 23 - Atividade da fosfoeno/piruvato carboxiquinase ($\text{nmol.mg prote\u00edna}^{-1}.\text{min}^{-1}$) do TAMI de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria

	Inervado	Desnervado
Controle	15,90 \pm 2,15 (6)	14,00 \pm 2,24 (6)
Cafeteria	5,14 \pm 0,78* (12)	5,88 \pm 0,74* (12)

Os valores representam a média \pm erro padrão. Os n\u00fameros entre par\u00eanteses representam o total de animais utilizados. * $P < 0,05$ vs controle.

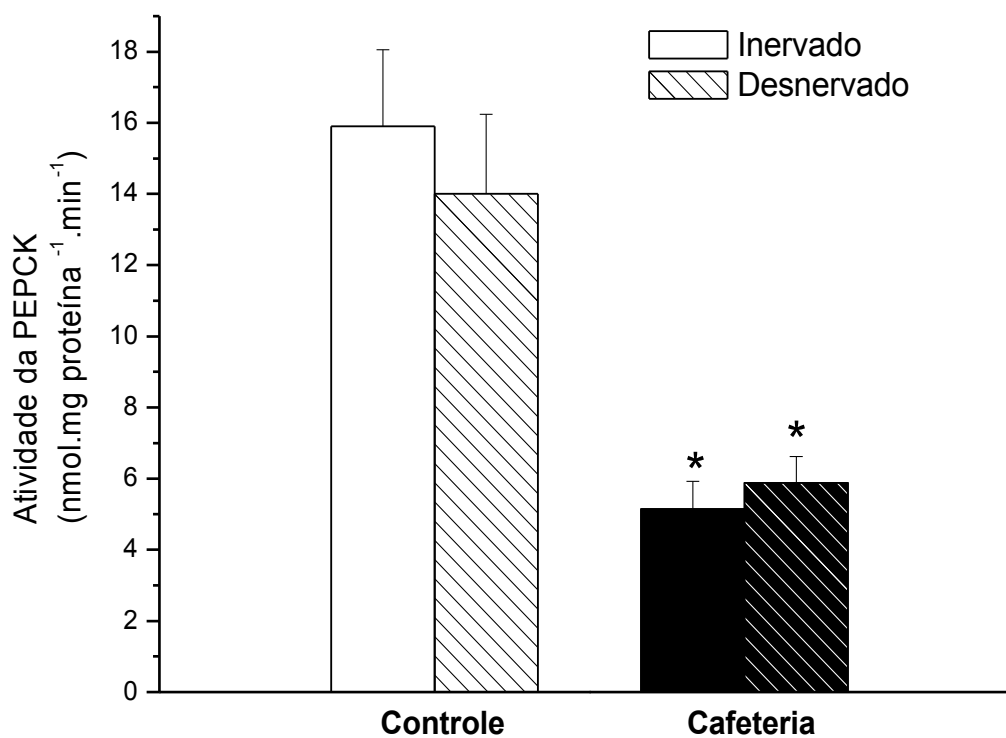


Figura 23 - Efeito da desnervação simpática unilateral na atividade da fosfoeno/piruvato carboxiquinase (PEPCK) do tecido adiposo marrom interescapular em ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria. Os valores representam a média \pm erro padrão de 6 – 8 animais.

4.9.5 Avaliação do processo de fosforilação direta do glicerol no tecido adiposo marrom interescapular (TAMI)

4.9.5.1 Velocidade de incorporação de glicerol-U-¹⁴C na fração glicerol de TAG pelo TAMI

O processo de fosforilação direta do glicerol foi estimado pela velocidade de incorporação de glicerol-U-¹⁴C na fração glicerol de TAG em fragmentos de TAMI em animais controles e alimentados com a dieta cafeteria (Tabela 24 e Figura 24). Os animais alimentados com a dieta cafeteria apresentaram um aumento de aproximadamente 85% no fluxo do processo de fosforilação direta do glicerol no TAMI em relação aos animais controles.

Tabela 24 - Incorporação de glicerol-U-¹⁴C em glicerol-TAG (nmol . g TAMI⁻¹. 2h⁻¹) em fragmentos do TAMI de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria

	nmol . g TAMI ⁻¹ . 2h ⁻¹
Controle	146,6 ± 15,3 (18)
Cafeteria	275,5 ± 47,2* (18)

Os valores representam a média ± erro padrão. Os números entre parênteses representam o total de animais utilizados. **P* < 0,05 vs controle.

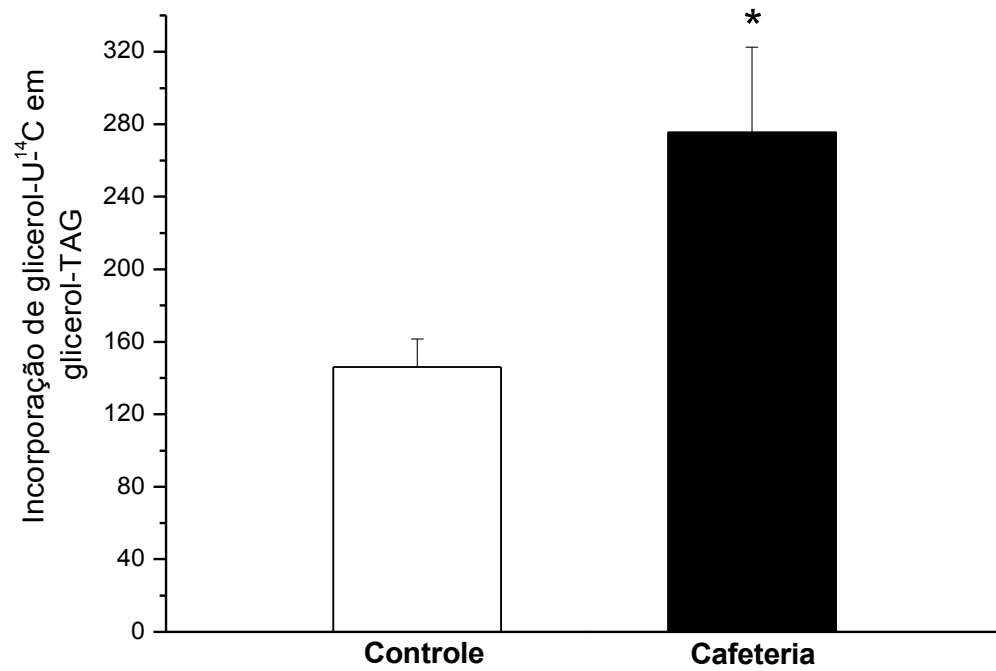


Figura 24. Efeito da dieta cafeteria na incorporação de glicerol-U-¹⁴C em glicerol de triacilglicerol nos fragmentos de tecido adiposo marrom interescapular. Os valores representam a média \pm erro padrão de 18 animais. * $P < 0,05$ versus controle.

4.9.5.2 Atividade da gliceroquinase

A atividade da gliceroquinase foi determinada no TAMI previamente hemidesnervado de animais controles e alimentados com a dieta cafeteria (Tabela 25 e Figura 25). Os animais alimentados com a dieta cafeteria apresentaram um aumento de aproximadamente 170% na atividade da gliceroquinase em relação aos animais controles. A desnervação simpática unilateral do TAMI bloqueou o aumento na atividade desta enzima nos animais alimentados com a dieta cafeteria e induziu uma diminuição de aproximadamente 50% nos animais controles.

Tabela 25 - Atividade da gliceroquinase ($\text{nmol} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) do TAMI de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria

	Inervado	Desnervado
Controle	$4,63 \pm 0,23$ (6)	$2,52 \pm 0,27^*$ (6)
Cafeteria	$12,55 \pm 1,17^\#$ (12)	$6,02 \pm 0,72^*$ (5)

Os valores representam a média \pm erro padrão. Os n\u00fameros entre par\u00eanteses representam o total de animais utilizados. * $P < 0,05$ vs inervado. # $P < 0,05$ vs controle.

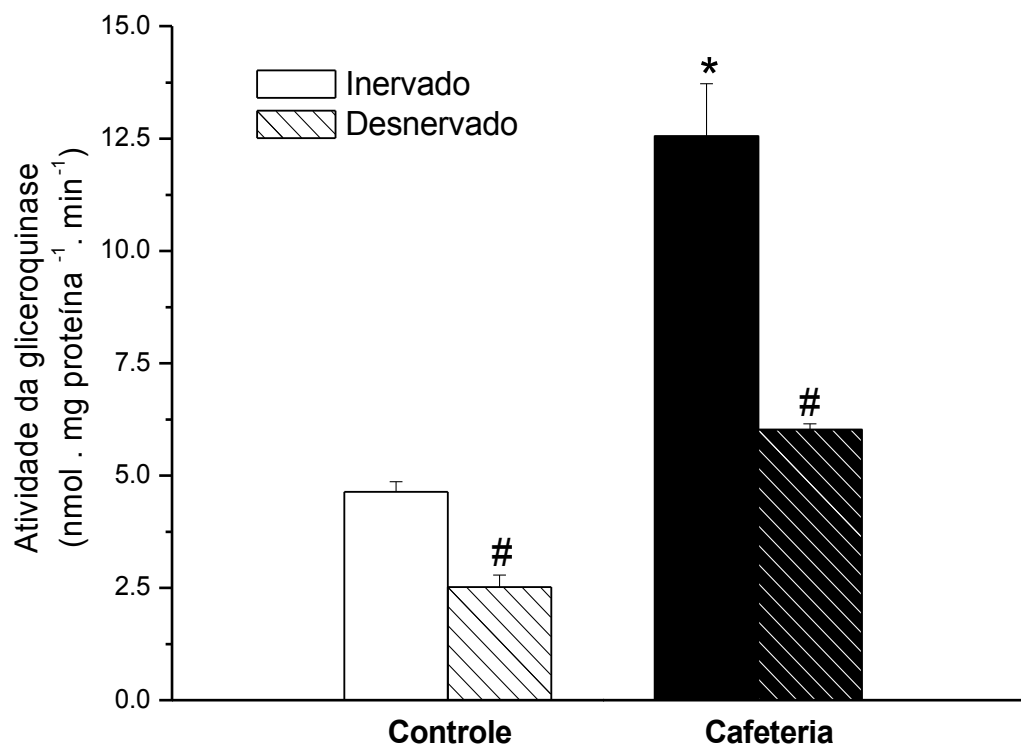


Figura 25. Efeito da desnervação simpática unilateral na atividade da gliceroquinase do tecido adiposo marrom interescapular em ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria. Os valores representam a média \pm erro padrão de 6 animais. * $P < 0,05$ vs controle. # $P < 0,05$ vs inervado.

4.9.6 Síntese *de novo* ácido graxo *in vivo*

O glicerol-3-fosfato, proveniente da glicose, da gliceroneogênese ou da fosforilação direta do glicerol, é utilizado para a esterificação dos ácidos graxos sintetizados *de novo* ou captados pré-formados pelo tecido. Os ácidos graxos pré-formados podem ser oriundos da hidrólise de triacilglicerol endógeno ou da hidrólise dos triacilgliceróis presentes nos quilomicrons e VLDL circulantes por ação da lipase lipoprotéica.

A síntese de ácidos graxos *de novo* foi avaliada no TAMI de ratos alimentados com a dieta cafeteria ou controles pela administração de $^3\text{H}_2\text{O}$ (Tabela 26 e Figura 26). A incorporação do trítio ocorre durante a síntese de ácidos graxos em ligações estáveis C-H por meio da troca de ^3H com os H dos nucleotídeos de pirimidina reduzidos (NADPH). Os animais alimentados com a dieta cafeteria apresentaram um aumento significativo na síntese de ácido graxo *de novo* no TAMI em relação aos animais controles.

Tabela 26 - Ácido graxo sintetizado *de novo* no TAMI de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria

	nmol . g TAMI ⁻¹ . min ⁻¹
Controle	11,60 ± 1,59
Cafeteria	22,78 ± 1,98*

Os valores representam a média ± erro padrão de 5 animais. * $P < 0,05$ vs controle.

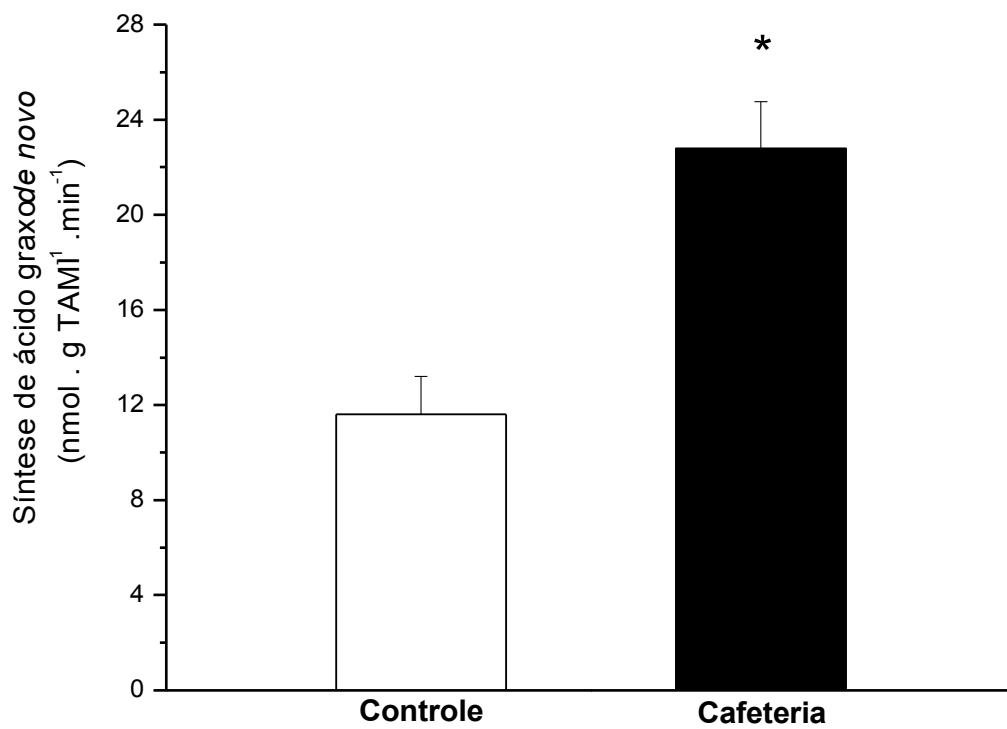


Figura 26. Efeito da dieta cafeteria na síntese *de novo* de ácido graxo *in vivo* pelo tecido adiposo marrom interescapular. Os valores representam a média \pm erro padrão de 6 animais. * $P < 0,05$ versus controle.

4.9.7 Atividade da lipase lipoprotéica

A enzima lipase lipoprotéica está presente no endotélio capilar e realiza a hidrólise de triacilglicerol de lipoproteínas (quilomícrons e VLDL) em ácidos graxos e glicerol. Os ácidos graxos são captados pelos adipócitos podendo ser incorporados em triacilglicerol. A dieta cafeteria promoveu uma redução na atividade da lipase lipoprotéica do TAMI em relação aos controles (Tabela 27 e Figura 27).

Tabela 27 - Atividade da lipase lipoprotéica no TAMI de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria

	nmol de ácido oléico liberado . min⁻¹ . mg proteína⁻¹
Controle	23,10 ± 1,11
Cafeteria	15,20 ± 0,77*

Os valores representam a média ± erro padrão de 12 animais. * $P < 0,05$ vs controle.

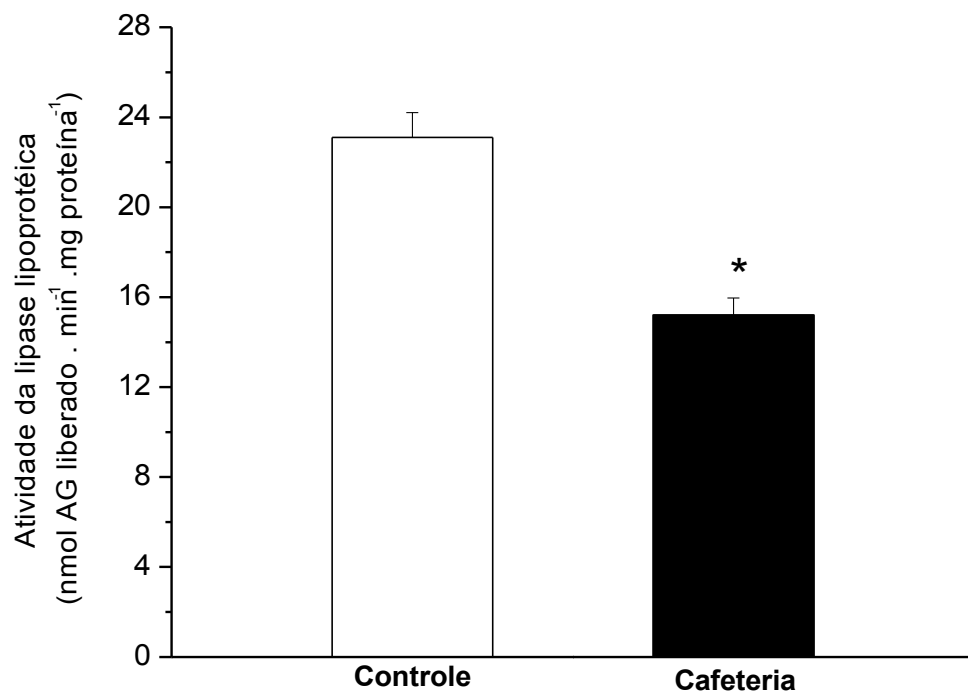


Figura 27 - Efeito da dieta cafeteria na atividade da lipase lipoprotéica no tecido adiposo marrom interescapular. Os valores representam a média \pm erro padrão de 12 animais. * $P < 0,05$ versus controle.

Discussão

5. Discussão

Esta seção foi dividida em dois subitens, **5.1)** tecido adiposo branco e **5.2)** tecido adiposo marrom, nos quais os efeitos na geração de glicerol-3-fosfato induzidos pela dieta cafeteria e pela desnervação cirúrgica simpática em cada um dos tecidos são discutidos. Inicialmente, a distribuição calórica da dieta cafeteria e as alterações induzidas pela dieta cafeteria nos níveis metabólicos e hormonais plasmáticos e na capacidade termogênica do tecido adiposo marrom (TAM) serão discutidas.

A alimentação selecionada pelos animais do grupo cafeteria permitiu um aumento de ~ 40% na ingestão calórica média em relação aos animais controles (Figura 2). Este aumento foi decorrente de um maior consumo de calorias proveniente de lipídios (145%) e de carboidratos (45%) (Tabela 2). O alto conteúdo lipídico da dieta cafeteria propiciou uma elevação nos níveis plasmáticos de triacilgliceróis (TAG) desses animais quando comparados aos controles (Tabela 3).

O aumento nos níveis plasmáticos de insulina (Tabela 3) no grupo alimentado com a dieta cafeteria foi provavelmente devido à adição de sacarose (20%) na água ingerida pelos animais. Essa hiperinsulinemia, um indicativo da resistência dos tecidos periféricos a esse hormônio, tem sido observada em ratos alimentados com dietas hipercalóricas similares (Davidson *et al.*, 1993; Rizkalla *et al.*, 1987). A administração de uma dieta cafeteria por 3 dias, mesmo não modificando os níveis plasmáticos de insulina, diminuiu a capacidade desse hormônio de suprimir a produção hepática de glicose em ratos durante o *clamp* hiperinsulinêmico euglicêmico. Uma clara redução (30%) na utilização de glicose estimulada pela insulina pelos tecidos periféricos foi detectada somente após 42 dias de administração da dieta (Davidson *et al.*, 1993). Os achados presentes no nosso

trabalho mostram que a utilização de glicose (Figuras 7 e 21) e a síntese de ácidos graxos (Figuras 12 e 26), processos estritamente dependentes de insulina, aumentam no tecido adiposo branco (epididimal e retroperitoneal) e marrom dos animais alimentados com a dieta cafeteria. Além disso, dados do nosso laboratório têm mostrado que ratos alimentados com a dieta cafeteria por 4, 6, 8 e 12 semanas não apresentam alteração na curva de tolerância à glicose (Carvalho & Kettelhut, dados não publicados). Tais achados sugerem que os altos níveis plasmáticos da insulina foram suficientes para superar alguma possível resistência de sua ação nos tecidos periféricos.

O aumento da atividade termogênica do TAM induzido pela dieta cafeteria, evidenciado pelo aumento no peso do TAM (Tabela 18), pelo conteúdo de UCP-1 (Figura 20), pela capacidade de ligação de GDP (Figura 19) e pela velocidade de renovação de noradrenalina (Figura 18), está de acordo com estudos prévios utilizando o mesmo tipo de dieta (Rothwell *et al.*, 1982^b; Young *et al.*, 1982; Cannon *et al.*, 2004). No presente trabalho, a dieta cafeteria induziu um aumento similar (~30%) na ligação de GDP e no conteúdo de UCP-1, demonstrando que o aumento na atividade termogênica do TAM foi decorrente do longo período de oferta da dieta hipercalórica aos animais.

Em contraste à ativação da produção de calor do TAM induzida pela dieta cafeteria (hipercalórica e hiperlipídica), dietas isocalóricas e hiperlipídicas parcialmente purificadas têm inibido a atividade termogênica do TAM, evidenciado por uma diminuição no peso do tecido, uma acentuada redução na utilização de glicose (Storlien *et al.*, 1986) e uma inibição na atividade da piruvato desidrogenase, complexo enzimático chave na regulação da síntese dos ácidos graxos (Holness *et al.*, 1999). Administração dessas dietas, por 24 dias, resulta em uma redução

superior a 50% na utilização de glicose corporal. Os principais efeitos inibitórios foram encontrados no músculo esquelético (29 – 61%) e no tecido adiposo marrom (78 – 90%), este último contribui com cerca de 20% na diminuição da utilização corporal total (Storlien *et al.* 1986). Tais achados sugerem que a inibição da atividade termogênica do TAM e a conseqüente diminuição na dissipação de energia podem propiciar um maior acúmulo de gordura corporal nos animais e a instalação da resistência insulínica.

Os trabalhos pioneiros no estudo da termogênese induzida pela dieta (*diet-induced thermogenesis*) demonstram um aumento na capacidade termogênica do TAM associado com modificação da composição corporal e manutenção do peso dos animais. Ratos Zucker alimentados, por 24 dias, com uma dieta hipercalórica (70%) do tipo cafeteria apresentam um aumento significativo (77%) no gasto energético, mas apresentam um aumento de cerca de 10 vezes no conteúdo de gordura corpórea, sem alteração do peso corporal (Rothwell *et al.*, 1982^c). Nossos resultados confirmam tais achados, tendo sido observado um aumento na atividade termogênica do TAM induzido pela dieta cafeteria e uma elevação no conteúdo de gordura corporal total, avaliada pelo conteúdo de ácido graxo total da carcaça (Tabela 4) e pelo peso de diferentes depósitos do tecido adiposo branco [epididimal, retroperitoneal, mesentérico e inguinal (Figura 4)], apesar da similaridade no ganho de peso corporal diário dos animais (Figura 2).

O papel fundamental do tecido adiposo marrom na termogênese independente de tremor muscular (*non-shivering thermogenesis*) foi confirmado pelo estudo em animais geneticamente modificados, no entanto, experimentos realizados com esses animais têm sido contraditórios no estabelecimento da importância da termogênese do TAM no controle do ganho de peso corporal de animais

alimentados com dietas hipercalóricas (*diet-induced thermogenesis*). Camundongos com remoção gênica da UCP-1 desenvolvem obesidade, avaliado pelo peso corporal e conteúdo corporal de lipídios, e suas complicações mórbidas: hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia (Lowell *et al.*, 1993). Por outro lado, camundongos incapazes de sintetizar noradrenalina e adrenalina em todo o organismo, por inativação do gene da dopamina β hidroxilase, não são obesos, apesar de apresentarem hiperfagia, mas são intolerantes ao frio (Thomas *et al.*; 1997). Da mesma forma, camundongos transgênicos com completa ausência de UCP-1 não são obesos, quando comparados com os controles, tanto quando alimentados com a dieta balanceada comercial como com a dieta hiperlipídica, mas são sensíveis ao frio (Enerbäck *et al.*, 1997; Liu *et al.*; 2003). Em contraste, recentemente foi demonstrado que esses mesmos animais (UCP-1 *knockout*) se tornam obesos e são incapazes de aumentar a termogênese no TAM e o gasto energético em resposta ao tratamento durante duas semanas com agonistas β_3 adrenérgicos, não reduzindo os depósitos de TAB e o conteúdo lipídico dos adipócitos marrons (Inokuma *et al.* 2006).

5.1) Tecido adiposo branco

Em todas as situações experimentais previamente investigadas (jejum, diabetes, exposição ao frio e adaptação à dieta hiperprotéica, livre de carboidratos), a atividade da gliceroneogênese está aumentada no TAB, enquanto a utilização de glicose, a atividade da gliceroquinase e a velocidade de incorporação de glicerol em glicerol-TAG estão reduzidas (Ballard *et al.*, 1967; Gorin *et al.*, 1969; Botion *et al.*, 1995; Botion *et al.*, 1998; Brito *et al.*, 2001; Festuccia, 2004; Boschini, 2006; Festuccia *et al.*, 2007). A ativação da via gliceroneogênica foi interpretada como um

mecanismo compensatório para garantir o suprimento contínuo e adequado de G3P, uma vez que o fornecimento deste metabólito pelas outras vias (glicolítica e pelo processo de fosforilação direta do glicerol) encontra-se reduzido (Botion *et al.*, 1998; Festuccia, 2004).

A administração da dieta cafeteria é a primeira situação em que uma diminuição do fluxo gliceroneogênico tem sido demonstrada, indicando que este processo pode ser inibido para ajustar o suprimento de G3P em uma situação em que a produção deste metabólito pelas outras vias (glicolítica e processo de fosforilação direta do glicerol) está ativada. Este achado suporta a hipótese que a atividade das vias geradoras de glicerol-3-fosfato são reguladas para manter um suprimento adequado de G3P necessário para a esterificação dos ácidos graxos e armazenamento do TAG. Por outro lado, o achado que nem a utilização de glicose nem a atividade gliceroneogênica do TAB retroperitoneal foram afetadas pela redução da atividade da gliceroquinase induzida pela desnervação do tecido sugere que a geração de G3P pela via glicolítica e pela via gliceroneogênica no TAB pode ser regulada independentemente do G3P produzido pela gliceroquinase, que é normalmente responsável pela reciclagem do glicerol derivado da hidrólise do TAG endógeno. Este controle (independente da gliceroquinase) também ocorre em ratos adaptados à dieta HP, em que a atividade da enzima é menor quando comparado aos controles alimentados com a dieta balanceada (Boschini, 2006). Desta forma, o suprimento de G3P necessário para esterificação dos ácidos graxos e síntese de TAG em diferentes condições fisiológicas parece ser controlada somente por mudanças recíprocas na geração de G3P a partir de glicose (via glicólise) e a partir da gliceroneogênese.

Os resultados obtidos na avaliação da velocidade de renovação de noradrenalina (Figura 5 e Tabela 6) são os primeiros a mostrar que a administração de uma dieta hipercalórica, além de elevar a atividade do sistema nervoso simpático (SNS) para o TAM, também aumenta a atividade simpática para o TAB. Recentemente foi demonstrado que a velocidade de renovação de noradrenalina aumenta no TAB retroperitoneal, mas não no epididimal, após a suplementação da dieta padrão com glicose ou frutose por 6 dias (Young *et al.*, 2004). Nossos resultados mostram que após 3 semanas de administração da dieta cafeteria, a velocidade de renovação de noradrenalina aumenta também no TAB epididimal, apesar deste efeito ser menos pronunciado que no TAB retroperitoneal. Dados prévios do laboratório mostraram que o jejum e a exposição de ratos ao frio aumenta a velocidade de renovação de noradrenalina e a lipólise no TAB (Migliorini *et al.*, 1997; Garófalo *et al.*, 1996). A realização de experimentos, incluindo a análise da atividade lipolítica do TAB, é necessária para o esclarecimento da importância fisiológica da ativação do SNS para o TAB em ratos alimentados com a dieta hipercalórica.

O SNS desempenha um papel importante na regulação da lipólise no TAB. As catecolaminas são capazes de estimular a hidrólise dos TAG do TAB pela ativação dos receptores β -adrenérgicos, produção de cAMP e estimulação da lipase hormônio sensível. No entanto, podem também prevenir a mobilização lipídica pela ativação dos receptores α_2 adrenérgicos e inibição da produção de cAMP (Carey *et al.*, 1998; Lafontan *et al.*, 1993). Ratos machos alimentados com a dieta hipercalórica e hiperlipídica do tipo cafeteria, por 15 dias, não apresentam diferença significativa na lipólise basal em adipócitos isolados do TAB retroperitoneal quando comparados ao controle. Entretanto, a administração desta dieta induz uma redução

significativa (40-60%) na lipólise estimulada *in vitro* pela noradrenalina, CGP12177A (agonista β_3 -adrenérgico parcial e antagonista β_1 - e β_2 -adrenérgico), BRL37344 (agonista β_3 -adrenérgico) e forskolina associado a um aumento no conteúdo de adrenoreceptores do tipo α_{2A} e uma diminuição no conteúdo de β_3 (Lladó *et al.*, 2002). A administração de uma dieta semipurificada rica em lipídios também promove uma diminuição na hidrólise dos TAG em adipócitos isolados do TAB retroperitoneal em resposta a agentes β adrenérgicos. No entanto, nenhuma alteração ocorre quando os adipócitos são incubados com dibutilil-cAMP e forskolina (Portillo *et al.*, 1999). Diferente dos achados obtidos no TAB retroperitoneal, a dieta hipercalórica e hiperlipídica do tipo cafeteria (15 dias) não promove alteração na lipólise basal ou na atividade lipolítica máxima do TAB epididimal induzida pela noradrenalina, pelo BRL 37344, pela forskolina e pelo dibutilil-cAMP, mas aumenta os níveis de mRNA do receptor β_3 adrenérgico em adipócitos isolados desse tecido (Lladó *et al.*; 2000). Esses dados corroboram o conceito das diferenças funcionais dos tecidos adiposos de diferentes regiões do organismo.

Nos estudos pioneiros, o aumento encontrado na gliceroneogênese do TAB de ratos diabéticos e jejuados foi interpretado como um mecanismo de restrição à mobilização de ácidos graxos e redução da cetoacidose (Reshef *et al.*; 1970). Recentemente foi demonstrado que os ácidos graxos são realmente potentes estimuladores da gliceroneogênese. A expressão da PEPCK é estimulada por ácidos graxos insaturados de cadeia longa tanto em adipócitos 3T3-F442A (Antras-Ferry *et al.*, 1994), quanto em adipócitos normais (Duplus *et al.*, 2002). Além disto, a transcrição do PPAR γ , um importante receptor nuclear envolvido na transcrição do gene da PEPCK, pode ser ativado por ácidos graxos (Tontonoz *et al.*, 1995). De fato, experimentos realizados *in vivo* mostram que, em ratos adaptados à dieta HP

ou alimentados com a dieta balanceada, a gliceroneogênese está envolvida principalmente com a esterificação de ácidos graxos preformados no TAB (Botion *et al.*, 1998). No entanto, os animais adaptados à dieta HP, apesar de apresentarem um aumento na geração de glicerol-3-fosfato pela gliceroneogênese quando comparado aos animais controles, apresentam uma redução na atividade lipolítica (Kettelhut *et al.*, 1985; Martins-Afféri *et al.*, 2004). Por outro lado, estes animais apresentam um aumento na atividade da lipase lipoprotéica, sendo que a administração de Triton WR1339, um inibidor da remoção dos TAG incorporados nas lipoproteínas circulantes, induz uma redução significativa na incorporação de ¹⁴C-piruvato em glicerol de TAG e na atividade da PEPCCK no tecido adiposo. Desta forma, os ácidos graxos preformados provenientes da dieta, captados dos quilomicrons e VLDL circulantes, também têm uma importante participação na estimulação da gliceroneogênese (Brito *et al.*, 2006).

Dois fatores distintos estão envolvidos na regulação da atividade da LPL no TAB, sendo que a insulina estimula a atividade desta enzima, enquanto a noradrenalina inibe. Apesar do aumento simultâneo dos níveis plasmáticos de insulina e da velocidade de renovação de noradrenalina no TAB, os animais alimentados com a dieta cafeteria apresentam um aumento na atividade da LPL no TAB retroperitoneal e epididimal (Figura 13) em relação aos animais controles. Este resultado foi semelhante aquele encontrado em adipócitos 3T3-L1 onde a presença de insulina no meio de incubação não permitiu alteração nos níveis da atividade da LPL induzida pela adrenalina (Chernick *et al.*, 1986). Considerando que tem sido sugerido que a atividade da LPL no TAB está sob controle negativo do cAMP (Wing *et al.*, 1968), podemos sugerir que a insulina ao ativar a fosfodiesterase 3B no tecido

adiposo, promovendo a redução dos níveis de cAMP, interfira na ação da noradrenalina na atividade enzimática da LPL.

Apesar do um aumento na utilização de ácidos graxos preformados circulantes pelo TAB dos animais alimentados com a dieta cafeteria, esses animais apresentaram uma redução da gliceroneogênese. Este achado indica que a insulina foi o fator predominante no controle da geração de G3P no TAB. Este hormônio, além de estimular a utilização de glicose pelo tecido num processo dependente da translocação do transportador de glicose (GLUT 4) das vesículas intracelulares para a membrana plasmática (Im *et al.* 2007), é um regulador dominante negativo da transcrição do gene da PEPCK-C devido à sua habilidade de suprimir rápida e completamente a expressão do gene da PEPCK-C. Este processo inibitório envolve vários fatores de transcrição que podem se ligar a uma série de sítios na região promotora deste gene para controlar sua expressão. Um dos fatores de transcrição regulado pela insulina é o C/EBP β (CAAT/enhancer binding protein). Este fator possui duas isoformas que são expressas de acordo com o estado hormonal e dietético do organismo, sendo C/EBP β -C1 a forma inibitória e C/EBP β -B1 a isoforma estimulatória da transcrição do gene da PEPCK. A insulina aumenta a concentração de C/EBP β -C1 através da via de sinalização da PI3K. No entanto, a repressão mediada pela insulina da transcrição do gene da PEPCK pelo fator C/EBP β -C1 não ocorre de forma imediata, requerendo cerca de 60 e 120 minutos para alterar a expressão gênica. O fator de transcrição *Forkhead* (FKHR) também tem sido sugerido como mediador da transcrição regulada pela insulina, no entanto, alguns experimentos mostram que FKHR inibe somente a transcrição do gene da enzima glicose-6-fosfatase e não altera a transcrição do gene da PEPCK. SREBP-1c (sterol regulatory element-binding protein), um outro fator de transcrição, bloqueia a

estimulação da transcrição da PEPCK induzida pelo CBP, coativador transcricional crítico na estimulação da expressão gênica da PEPCK induzida pelo cAMP (CBP, CREB binding protein). Há dados demonstrando que a superexpressão da SREBP-1c no tecido adiposo causa lipodistrofia em camundongos transgênicos (Chakravarty, 2005; Chakravarty *et al.*, 2007).

Além dos efeitos da insulina na regulação gênica da enzima chave da gliceroneogênese, dados do nosso laboratório indicam que a própria glicose (5 mM) inibe o fluxo gliceroneogênico *in vitro* no TAB de ratos adaptados à dieta HP, avaliado pela incorporação de 2-¹⁴C piruvato em glicerol de TAG (Botion *et al.*, 1995).

Assim, a diminuição da gliceroneogênese no TAB dos ratos alimentados com a dieta cafeteria resulta da combinação do aumento no fluxo glicolítico e nos níveis plasmáticos de insulina e de uma menor estimulação da via gliceroneogênica pelos ácidos graxos provenientes da hidrólise dos TAG endógenos (lipólise), apesar do aumento na utilização de ácidos graxos preformados circulantes.

Papel do sistema nervoso simpático na geração de G3P do TAB

A desnervação do TAB retroperitoneal dos animais alimentados com a dieta cafeteria não induziu alteração na via glicolítica, avaliada pela captação de glicose *in vivo* (Figura 14), nem na gliceroneogênese, avaliada pela atividade da PEPCK (Figura 16) e pela incorporação de 1-¹⁴C piruvato em glicerol de TAG (Figura 15). A mesma resposta qualitativa foi encontrada após a desnervação do TAB retroperitoneal de ratos alimentados com a dieta balanceada semi-purificada [dieta N (Boschini, 2006)]. Em ambas as situações (dieta cafeteria e N), os níveis plasmáticos de insulina e a velocidade de renovação de noradrenalina estão

aumentados em comparação aos animais controles (alimentados com a dieta comercial e adaptados à dieta HP, respectivamente). Ao contrário, a desnervação cirúrgica unilateral do TAB retroperitoneal de ratos alimentados com a dieta balanceada comercial, jejuados, diabéticos, expostos ao frio e adaptados à dieta HP promove um aumento na geração de glicerol-3-fosfato pela via glicolítica, avaliada pela captação de glicose *in vivo*, e uma diminuição na via gliceroneogênica, avaliada pela velocidade de incorporação de $1\text{-}^{14}\text{C}$ piruvato em glicerol de TAG e pela atividade da PEPCK (Frasson, 2005; Boschini, 2006). O aumento da geração de G3P pela via glicolítica ocorre concomitante à diminuição da produção deste metabólito pela via gliceroneogênica, sugerindo uma regulação reciprocamente coordenada. Estes achados foram interpretados como um efeito indireto do SNS uma vez que a desnervação simpática do tecido aumenta a sua sensibilidade à ação insulínica. Com exceção dos ratos alimentados com a dieta balanceada comercial, todas as situações citadas acima (jejum, diabetes, exposição ao frio e adaptação à dieta HP) apresentam diminuição nos níveis de insulina plasmática. Tem sido demonstrado que a exposição de adipócitos isolados de ratos ao isoproterenol induz uma diminuição na captação de glicose estimulada pela insulina. Este efeito não envolve alteração na atividade tirosina quinase do receptor de insulina e pode ser revertido somente se o agonista β adrenérgico for removido após uma hora de sua adição (Sandra *et al.*, 1987; Arsenis *et al.*, 1986). Esta inibição adrenérgica do transporte de glicose é dependente principalmente dos receptores β_3 adrenérgicos (Carpéné *et al.*, 1993). Mais recentemente, foi demonstrado que a estimulação β adrenérgica inibe a captação de glicose em adipócitos 3T3-L1, via β_2 e β_3 adrenérgicos, por interferir com a translocação do GLUT4 das vesículas intracelulares para a membrana plasmática (Mulder *et al.*, 2005). Ao contrário, a

diminuição do número de receptores β -adrenérgicos em adipócitos pela infusão prolongada de isoproterenol em ratos promove um aumento da sensibilidade das células a ação da insulina (Green *et al.*, 1996). O efeito inibitório das catecolaminas na utilização de glicose induzida pela insulina em adipócitos isolados de ratos tem sido verificado somente quando estas células são incubadas em baixas concentrações (10 a 300 μ U/mL) de insulina (Kirsch *et al.*; 1983). Da mesma forma, nenhuma alteração foi encontrada na geração de G3P pelas vias glicolítica e gliceroneogênica após desnervação simpática cirúrgica do TAB nas situações fisiológicas (dietas cafeteria e N) em que o tecido adiposo já se encontra estimulado pela insulina.

A desnervação simpática do TAB retroperitoneal reduz a atividade da gliceroquinase em animais alimentados com a dieta cafeteria e HP (Boschini, 2006). Estas situações apresentam aumento e diminuição na velocidade de renovação de noradrenalina, respectivamente. A infusão prolongada de noradrenalina e de agonista β_3 -adrenérgico aumenta a atividade da GK no TAB. Este achado tem sugerido que o efeito da estimulação simpática na atividade da gliceroquinase do TAB é mediada por receptores adrenérgicos do tipo β_3 (Boschini, 2006). Tais resultados mostram que a fosforilação direta do glicerol pela gliceroquinase apesar de baixa, em relação a outros tecidos, não deve ser desprezada, podendo ser controlada por fatores neurais.

5.2) Tecido adiposo marrom

A administração da dieta cafeteria é a primeira situação em que uma diminuição na gliceroneogênese no TAM é demonstrada, indicando que esta via pode ser regulada e inibida para ajustar o suprimento de G3P necessário à

esterificação dos AGs e a formação de TAG. Em várias condições experimentais previamente investigadas (jejum, diabetes e adaptação à dieta HP), o fluxo gliceroneogênico no TAM encontra-se aumentado (Ballard *et al.*, 1967; Gorin *et al.*, 1969; Botion *et al.*, 1995; Botion *et al.*, 1998; Brito *et al.*, 1999; Festuccia *et al.*, 2003^a). Nestas situações citadas, a capacidade termogênica e a atividade simpática, bem como a utilização de glicose, a atividade da gliceroquinase e a velocidade de incorporação de glicerol em glicerol-TAG encontram-se reduzidas no TAM, ao contrário, da gliceroneogênese (Hayashi *et al.*, 1993; Brito *et al.*, 1992; Brito *et al.*, 1998; Kawashita *et al.*, 2002^a; Kawashita *et al.*, 2002^b; Festuccia *et al.*, 2003^a). Assim como no TAB, a ativação da gliceroneogênese no TAM foi interpretada como um mecanismo compensatório para garantir a produção contínua de G3P em situações em que a geração deste metabólito pelas outras vias encontra-se diminuída (Festuccia *et al.*, 2003^a). No TAM de ratos expostos ao frio durante 10 dias, contudo, todos os processos descritos acima, incluindo a gliceroneogênese estão ativados. Devido à ativação pronunciada da hidrólise de TAG induzida pelo frio, condição de alta necessidade de produção de calor, foi sugerido que a geração de G3P pela glicólise e pelo processo de fosforilação direta do glicerol pela gliceroquinase, embora aumentada, não tenha sido suficiente para manter a síntese adequada de TAG (Moura *et al.*, 2005). A diminuição da gliceroneogênese (Figuras 22 e 23) observada no TAM dos ratos alimentados com a dieta cafeteria sugere que a geração de G3P a partir de glicerol (Figuras 24 e 25) e glicose (Figura 21) encontra-se suficientemente elevada para garantir um suprimento contínuo de G3P com uma menor participação da gliceroneogênese.

A exposição dos animais ao frio e a administração de uma dieta hipercalórica (cafeteria) apesar de aumentarem a capacidade termogênica do TAM têm efeitos

opostos na gliceroneogênese do tecido. Deve ser considerado que, em contraste com os níveis aumentados de insulina (Tabela 3) observados nos ratos alimentados com a dieta cafeteria, a concentração deste hormônio foi reduzida em animais expostos ao frio (Moura *et al.*, 2005). Além de estimular a utilização de glicose, a insulina é capaz de inibir, como citado no [item 5.1](#), a expressão da PEPCK. Baixas concentrações de insulina plasmática são características de situações em que um aumento do fluxo gliceroneogênico tem sido demonstrado: jejum, diabetes e adaptação à dieta HP (Kawashita *et al.*, 2002^c Festuccia *et al.*, 2003^a). Os ácidos graxos também desempenham um papel importante no controle da gliceroneogênese, agindo como moduladores positivos deste processo. Estudos prévios usando a técnica de dupla marcação *in vivo*, em ratos alimentados com a dieta balanceada, indicaram a existência de uma relação positiva entre a gliceroneogênese e a quantidade de glicerol-TAG usado para esterificação de ácidos graxos preformados no TAM (Brito *et al.*, 1999). Essa mesma correlação foi observada no TAM de ratos expostos ao frio (Moura *et al.*, 2005). Estes achados são consistentes com o aumento da oferta de ácidos graxos ao TAM em ratos jejuados, diabéticos ou expostos ao frio. A exposição dos animais ao frio também induz um aumento significativo na atividade da LPL no TAM (Moura *et al.*, 2005), uma evidência da utilização aumentada de ácidos graxos pelo tecido. Em ratos alimentados com a dieta cafeteria, contudo, a atividade específica da LPL diminuiu (Figura 27), indicando uma utilização reduzida dos ácidos graxos preformados circulantes pelo TAM destes animais. Este achado e o aumento na síntese de ácido graxo *de novo* induzido pela insulina (Figura 26) sugerem que, diferentemente da exposição ao frio, a maioria do glicerol sintetizado pela diminuída gliceroneogênese foi utilizada para esterificar ácidos graxos sintetizados *de novo*. A realização de

experimentos, especialmente *in vivo* usando a técnica de dupla marcação, é necessária para esclarecer esta hipótese. Também deve ser considerado que a hidrólise dos TAG endógenos é provavelmente menos pronunciada durante a termogênese induzida pela dieta quando comparado com a termogênese induzida pelo frio, exigindo um menor requerimento de G3P para a síntese de TAG nos animais alimentados com a dieta cafeteria que naqueles expostos ao frio. A diminuição da gliceroneogênese em ratos alimentados com a dieta cafeteria apesar do aumento da hidrólise do TAG endógeno no TAM, um tecido que não mobiliza ácidos graxos, indica que a importância fisiológica desta via não está estritamente relacionada à sua participação na reesterificação dos ácidos graxos.

Em adição à ação da insulina e dos ácidos graxos, achados do nosso laboratório mostram que o fluxo gliceroneogênico pode ser controlado pela própria glicose. A incubação de fragmentos de TAM de ratos diabéticos (72h) com 5mM de glicose durante 2 horas reduz a gliceroneogênese, avaliado pela incorporação de ^{14}C piruvato em glicerol de TAG (Chaves & Migliorini, dados não publicados). Da mesma forma, o fluxo gliceroneogênico é menor em fragmentos de TAM de ratos adaptados à dieta HP incubados na presença de 5mM de glicose quando comparado ao tecido incubado na presença de 1mM de glicose (Brito, 1995). Esses achados ressaltam a necessidade de realização de mais experimentos para o esclarecimento dos mecanismos bioquímicos envolvidos no controle da geração de G3P pela gliceroneogênese.

Papel do sistema nervoso simpático na geração de G3P do TAM

A desnervação unilateral do TAM dos ratos alimentados com a dieta cafeteria não modificou a utilização de glicose (Figura 21) ou a gliceroneogênese (Figuras 22

e 23) apesar da significativa inibição da gliceroquinase (Figura 25). Devido à alta atividade da gliceroquinase no TAM (10 vezes maior que no TAB) e a rica inervação simpática desse tecido, os nossos achados fornecem fortes evidências que o suprimento de G3P para a síntese de TAG em diferentes condições nutricionais pode ser ajustada independentemente do sistema nervoso simpático (SNS) e somente por mudanças recíprocas na geração de G3P *via* glicólise e *via* gliceroneogênese, sem nenhuma participação do processo de fosforilação direta do glicerol pela gliceroquinase. Outras evidências obtidas em nosso laboratório têm indicado que a gliceroneogênese do TAM não está sob controle do SNS. A desnervação unilateral do TAM não afeta a atividade da PEPCK nem em ratos alimentados com a dieta balanceada nem com a dieta HP, em que a atividade desta enzima encontra-se elevada (Festuccia *et al.* 2003^a). Além disto, a desnervação do TAM não interfere com a restauração da atividade da PEPCK para valores semelhantes ao dos animais controles após a substituição da dieta HP pela dieta balanceada (Kawashita *et al.* 2002^c).

O aumento na atividade da gliceroquinase induzido pela dieta hipercalórica, bem como sua redução causada pela desnervação (Figura 25), estão de acordo com achados prévios deste laboratório mostrando que a gliceroquinase é controlada diretamente pelo SNS. Tanto a atividade quanto a expressão da enzima diminuem acentuadamente após a desnervação do TAM e aumentam em situações, como a exposição ao frio, em que o fluxo simpático para esse tecido é elevado. Efeitos semelhantes na atividade e na expressão da GK no TAM foram também obtidos pela infusão prolongada de noradrenalina ou de agonistas β -adrenérgicos, sendo esses efeitos inibidos por β -antagonistas, mas não por antagonistas α -adrenérgicos (Festuccia *et al.*, 2003^b). Nos ratos adaptados à dieta hiperprotéica, em que o fluxo

simpático para o TAM encontra-se reduzido (Brito *et al.*, 1998), a atividade da GK está reduzida. Apesar disso, após desnervação simpática cirúrgica do tecido a atividade da enzima torna-se ainda menor (Kawashita *et al.*, 2002^b).

A utilização de glicose pelo TAM pode ser regulada independentemente pelos níveis plasmáticos de insulina e pelo SNS (Shimizu *et al.*, 1998). O achado que a desnervação do TAM dos ratos alimentados com a dieta cafeteria não afetou a captação de glicose (Figura 21) indica que este efeito da dieta foi apenas devido aos níveis circulantes de insulina, um bem conhecido estimulador da utilização de glicose. Ao contrário, a desnervação do TAM dos animais controles promoveu uma redução significativa do índice de utilização de glicose pelo tecido, indicando que o SNS é o principal responsável pela regulação da utilização de glicose nesses animais.

Resumo geral dos principais achados:

Os resultados obtidos em relação às vias geradoras de glicerol-3-fosfato (G3P) no TAB (retroperitoneal e epididimal) e no TAM podem ser resumidos da seguinte forma: **a)** a produção de G3P de dihidroxiacetona na via glicolítica foi ativada pela dieta cafeteria, como evidenciado pelo aumento na utilização de glicose *in vivo*; **b)** a produção de G3P pela fosforilação direta do glicerol foi também ativada pela dieta cafeteria, como indicado pelo aumento na atividade da gliceroquinase e na velocidade de incorporação de ¹⁴C-glicerol em glicerol de TAG; **c)** em contraste ao aumento na geração de G3P por estas duas vias, a dieta cafeteria induziu uma redução do fluxo gliceroneogênico, evidenciado pela diminuição na atividade da PEPCCK e na velocidade de incorporação de 1-¹⁴C piruvato em glicerol de TAG; e **d)** a desnervação do tecido adiposo branco retroperitoneal e marrom dos animais

alimentados com a dieta cafeteria, apesar de promover acentuada redução na atividade da gliceroquinase, não afetou significativamente a utilização de glicose e a gliceroneogênese. Nossos resultados indicam que, tanto no tecido adiposo branco quanto no tecido adiposo marrom, a geração de glicerol-3-fosfato pela glicólise e pela gliceroneogênese pode ser regulada de forma coordenadamente recíproca independente do processo de fosforilação direta do glicerol pela gliceroquinase e do sistema nervoso simpático.

Tabela 29 – Resumo do efeito da dieta cafeteria nas vias de geração de glicerol-3-fosfato dos tecidos adiposos branco (TAB) e marrom (TAM) de ratos em relação à dieta controle.

	TAB		TAM	
	Inervado	Desnervado	Inervado	Desnervado
Captação de glicose	↑	↑	↑	↑
Atividade da gliceroquinase	↑	↓	↑	↓
Gliceroneogênese	↓	↓	↓	↓
Atividade da PEPCK	↓	↓	↓	↓

As setas vermelhas representam o efeito da desnervação do TAB e TAM dos ratos alimentados com a dieta cafeteria em relação ao tecido contralateral inervado.

Referências Bibliográficas

6. Referências Bibliográficas

Arsenis, G.; Livingston, J.N. Isoproterenol reduces insulin stimulation of hexose uptake by rat adipocytes via a postinsulin binding alteration. *Endocrinology* 119: 50-57, 1986.

Ashby, P.; Bennett, D.P.; Spencer, I.M.; Robinson, D.S. Post-translational regulation of lipoprotein lipase activity in adipose tissue. *Biochem. J.* 176: 865-872, 1978.

Antras-Ferry, J.; Le Bigot, G.; Robin, P.; Robin, D.; Forest, C. Stimulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression by fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203: 385-391, 1994.

Bachelard, H.S.; Clarck, A.G.; Thompson, M.F. Elucidation of reaction mechanisms by substrates and dead end inhibitor kinetic analysis. *Biochem. J.* 123: 707-715, 1971.

Ballard, F.J.; Hanson, R.W. Phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate carboxylase in developing rat liver. *Biochem. J.* 104: 866-871, 1967.

Ballard, F.J.; Hanson, R.W.; Leveille, G.A. Phosphoenolpyruvate carboxykinase and synthesis of glyceride-glycerol from pyruvate in adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 242: 2746-2750, 1967.

Belfrage, P.; Fredrikson, G.; Nilsoon, N.O.; Stralfors, P. Regulation of adipose-tissue lipolysis by phosphorylation of hormone-sensitive lipase. *Int. J. Obes.* 5: 635-641, 1981.

Belfrage, P.; Vaughan, M. Simple liquid-liquid partition system for isolation of labeled oleic acid from mixtures with glycerides. *J. Lipid Res.* 10: 341-4, 1969.

Bergö, M.; Wu, G.; Ruge, T.; Olivecrona, T. Down-regulation of adipose tissue lipoprotein lipase during fasting requires that a gene, separate from the lipase gene, is switched on. *J. Biol. Chem.* 277: 11927-11932, 2002.

Bertin, R.; Andriamihaja, M.; Portet, R. Glycerokinase activity in brown and white adipose tissues of cold-adapted obese Zucker rats. *Biochimie* 66: 569-572, 1984.

Bidder, T.G.J. Hexose translocation across blood brain interface configural aspects. *Neurochem.* 15: 867-874, 1968.

Borensztajn, J.; Samols, D.R.; Rubenstein H. Effects of insulin on lipoprotein lipase activity in the rat heart and adipose tissue. *Am. J. Physiol.* 223: 1271-1275, 1972.

Boschini, R.P. *Controle da geração de glicerol-3-fosfato no tecido adiposo de ratos adaptados à dieta hiperprotéica, livre de carboidratos – Papel do sistema nervoso simpático.* Ribeirão Preto, 2006, 58p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Botion, L.M.; Brito, M.N.; Brito, N.A.; Brito, S.R.C.; Kettelhut, I.C.; Migliorini, R.H. Glucose contribution to in vivo synthesis of glyceride-glycerol and fatty acids in rats adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet. *Metabolism* 47: 1217-1221, 1998.

Botion, L.M.; Kettelhut, I.C.; Migliorini, R.H. Increased adipose tissue glyceroneogenesis in rats adapted to high protein, carbohydrate-free diet. *Horm. Metab. Res.* 27: 310-313, 1995.

Brito, M.N. *Alterações metabólicas do tecido adiposo marrom interescapular de ratos adaptados à dieta rica em proteínas.* Ribeirão Preto, 1995, 130p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Brito, M.N.; Brito, N.A.; Brito, S.R.C.; Moura, M.A.F.; Kawashita, N.H.; Kettelhut, I.C.; Migliorini, R.H. Brown adipose tissue triacylglycerol synthesis in rats adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet. *Am. J. Physiol.* 276: R1003-R1009, 1999.

Brito, M.N.; Brito, N.A.; Garófalo, M.A.R.; Kettelhut, I.C.; Migliorini, R.H. Sympathetic activity in brown adipose tissue from rats adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet. *J. Autonomic Nerv. Syst.* 69: 1 – 5, 1998.

Brito, M.N.; Brito, N.A.; Migliorini, R.H. Thermogenic capacity of brown adipose tissue is reduced in rats fed a high protein, carbohydrate-free diet. *J.Nutr.* 122: 2081-2086, 1992.

Brito, S.R.C. *Lipogênese e gliceroneogênese no tecido adiposo de ratos adaptados à dieta hiperprotéica.* Ribeirão Preto, 2000, 105p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Brito, S.R.C.; Festuccia, W.L.; Kawashita, N.H.; Moura, M.F.; Xavier, A.R.; Garófalo, M.A.R.; Kettelhut, I.C.; Migliorini, R.H. Increased glyceroneogenesis in adipose tissue from rats adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet: role of dietary fatty-acids. *Metabolism* 55: 84-89, 2006.

Brito, S.R.C.; Moura, M.A.F.; Kawashita, N.H.; Brito, M.N.; Kettelhut, I.C.; Migliorini, R.H. Glucose uptake and glycolytic flux in adipose tissue from rats adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet. *Metabolism* 50: 1208-1212, 2001.

Carneheim, C.; Nedergaard, J.; Cannon B. β -adrenergic stimulation of lipoprotein lipase in rat brown adipose tissue during acclimation to cold. *Am. J. Physiol.* 246: E327-E333, 1984.

Cannon, B.; Houstek, J.; Nedergaard, J. Brown adipose tissue. More than an effector of thermogenesis? *Ann. NY Acad. Sci.* 856: 171-187, 1998.

Cannon, B.; Lindberg, O. Mitochondria from adipose tissue: isolation and properties. *Methods in Enzymology*, 54: 65-78, 1979.

Cannon, B.; Nedergaard, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* 84: 277-359, 2004.

Cantu, R.; Goodman, M. Effects of denervation and fasting on white adipose tissue. *Am. J. Physiol.*, 212(1): 207-212, 1967.

Carey, G.B. Mechanisms regulating adipocyte lipolysis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 441: 157-170, 1998.

Carpéné, C.; Chalaux, E.; Lizarbe, M.; Estrada, A.; Mora, C.; Palacin, M.; Zorzano, A.; Lafontan, M.; Testar, X. β_3 -adrenergic receptors are responsible for the adrenergic inhibition of insulin-stimulated glucose transport in rat adipocytes. *Biochem. J.* 296: 99-105, 1993.

Chakravarty, K.; Cassuto, H.; Reshef, L.; Hanson, R.W. Factors that control the tissue-specific transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase-C. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 40: 129-154, 2005.

Chakravarty, K.; Hanson, R.W. Insulin regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase-C gene transcription: the role of sterol regulatory element-binding protein 1c. *Nut. Rev.* 65: S47-S56, 2007.

Chaves, V.E.; Frasson, D; Martins-Santos, M.E.; Boschini, R.P.; Garófalo, M.A.R.; Festuccia, W.T.L.; Kettelhut, I.C.; Migliorini, R.H. Glyceroneogenesis is reduced and glucose uptake is increased in adipose tissue from cafeteria diet-fed rats independently of tissue sympathetic innervation. *J.Nutr.* 136: 2475-2480, 2006.

Chernick, S.S.; Spooner, P.M.; Garrison, M.M.; Scow, R.O. Effect of epinephrine and other lipolytic agents on intracellular lipolysis and lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes. *J. Lipid Res.* 27: 286-294, 1986.

Clifford GM, Londos C, Kraemer FB, Vernon RG, Yeaman SJ. Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 275 : 5011–5015, 2000.

Cousin, B.; Casteilla, L; Lafontam, M.; Ambid, L.; Langin, D.; Berthault, M.; Penicaud, L. Local sympathetic denervation of white adipose tissue in rats induces preadipocyte proliferation without noticeable changes in metabolism. *Endocrinology*, 133: 2255-2262, 1993.

Costa, E.; Boullin, D.J.; Hammer, W.; Vogel, W.; Brodie, B.B. Interactions of drugs with adrenergic neurons. *Pharmacol. Rev.* 18: 577-597, 1966.

Davidson, M.B.; Garvey, D. Studies on mechanisms of hepatic insulin resistance in cafeteria-fed rats. *Am. J. Physiol.* 264: E18-23, 1993.

Deshaies, Y.; G elo en, A.; Paulin, A.; Marette, A.; Bukowiecki, L.J. Tissue-specific alterations in lipoprotein lipase activity in the rat after chronic infusion of isoproterenol. *Horm. Metab. Res.* 25: 13-16, 1993.

Dole, V.P.; Meinertz, H. Microdetermination of long chain fatty acids in plasma and tissues. *J. Biol. Chem.* 235: 2595-2599, 1960.

Duplus, E.; Glorian, J.; Tordjman, J.; Berge, R.; Forest, C. Evidence for selective induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression by unsaturated and nonmetabolized fatty acids in adipocytes. *J. Cell Biochem.* 85: 651-661, 2002.

Eagle, G.R.; Robinson, D.S. The ability of actinomycin D to increase the clearing-factor lipase activity of rat adipose tissue. *Biochem. J.* 93: 10C-11C, 1964.

Ennerback, S.; Jacobsson, A.; Simpson, E. M.; Guerra, C.; Yamashita, H.; Harper, M.E.; Kozak, L.L. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* 387: 90-94, 1997.

Erskine, J.M.; Jensen, D.R.; Eckel, R.H. Macronutrient regulation of lipoprotein lipase is posttranslational. *J. Nut.* 124: 500-507, 1994.

Ferr e, P.; Leturque, A.; Brunol, A.F.; Penicaud, L.; Girard, J. A method to quantify glucose utilization *in vivo* in skeletal muscle and white adipose tissue of anesthetized rat. *Biochem. J.* 228: 103-110, 1985.

Festuccia, W.T.L. *Controle do metabolismo de lipídios no tecido adiposo marrom e branco*. Ribeirão Preto, 2004, 135p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Festuccia, W.T.L.; Frasson, D.; Chaves, V.E.; Martins-Santos, M.E.S.; Boschini, R.P.; Garófalo, M.A.R.; Kettelhut, I.C.; Migliorini, R.H. Adipose tissue glyceroneogenesis is increased in rats acutely exposed to cold. Manuscrito em preparação.

Festuccia, W.T.L.; Kawashita, N.H.; Garófalo, M.A.R.; Moura, M.A.F.; Brito, S.R.C.; Kettelhut, I.C.; Migliorini, R.H. Control of glyceroneogenic activity in rat brown adipose tissue. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285: R177-R182, 2003^a.

Festuccia, W.T.L.; Guerra-Sá, R.; Kawashita, N.H.; Garófalo, M.A.R.; Evangelista, E.A.; Rodrigues, V.; Kettelhut, I.C.; Migliorini, R.H. Expression of glycerokinase in brown adipose tissue is stimulated by the sympathetic nervous system. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 284: R1536-R1541, 2003^b.

Folch, J.; Less, M.; Stanley, G.A. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509, 1957.

Foretz, M.; Guichard, C.; Ferre, P.; Fofelle, F. Sterol regulatory element binding protein 1c is a major of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 12737-12742, 1999.

Foster, D.; Depocas, F.; Zaror-Behrens, G. Unilaterality of the sympathetic innervation of each pad of rat interscapular brown adipose tissue. *Can.J.Physiol. Pharmacol.* 60: 107-113, 1982.

Franckhauser, S.; Munoz, S.; Pujol, A.; Casellas, A.; Riu, E.; Otaegui, P.; Su, B.; Bosch, F. Increased fatty-acid re-esterification by PEPCCK overexpression in adipose tissue leads to obesity without insulin resistance. *Diabetes*, 51: 624-630, 2002.

Frasson, D. *Papel do sistema nervoso simpático na captação de glicose e na gliceroneogênese no tecido adiposo branco.* Ribeirão Preto, 2005, 67p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Garlid, K.D.; Jaburek, M.; Jekek, P.; Varecha, M. How do uncoupling proteins uncouple? *Biochim. Biophys. Acta* 1459: 383-389, 2000.

Garófalo, M.A.R.; Kettelhut, I.C.; Roselino, J.E.S.; Migliorini, R.H. Effect of acute cold exposure on norepinephrine turnover rates in rat white adipose tissue. *J. Autonomic Nerv. Syst.* 60: 206-208, 1996.

Granneman, J.G.; Wade, G.N. Effects of sucrose overfeeding on brown adipose tissue lipogenesis and lipoprotein lipase activity in rats. *Metabolism* 32: 202-207, 1983.

Griffin, M.J.; Sul, H.S. Insulin regulation of fatty acid synthase gene transcription: roles of USF and SREBP-1c. *IUBMB Life* 56: 595-600, 2004.

Gorin, E.; Tal-Or, Z.; Shafrir, E. Glyceroneogenesis in adipose tissue of fasted, diabetic and tiamcinolone treated rats. *Eur. J.Biochem.* 8: 370-375, 1969.

Goubern, M.; Porter R. Circadian rhythm and hormonal sensitivity of lipoprotein lipase in cold-acclimated rats. *Horm. Metab. Res.* 13: 73-77, 1981.

Green, A.; Carroll, R.M.; Dobias, S.B. Desensitization β -adrenergic receptors in adipocytes causes increased insulin sensitivity of glucose transport. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 271: E271-E276, 1996.

Haemmerle, G.; Zimmermann, R.; Hayn, M.; Theussl, C.; Waeg, G.; Wagner, E.; Sattler, W.; Magin, T.M.; Wagner, E.F.; Zechner, R. Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J Biol Chem* 277: 4806–4815, 2002.

Hahn, P.; Greenberg, R. The development of pyruvate kinase, glycerol kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase activities in liver and adipose tissue of the rat. *Experientia* 24: 428-429, 1968^a.

Hahn, P.; Greenberg, R., Dobiášová, M., Drahota, Z. Triglyceride synthesis from various precursors in adipose tissue of the rat during development. *Can. J. Biochem.* 46: 735-741, 1968^b.

Hahn, P.; Kirby, L.T. Immediate and late effects of premature weaning and of feeding a high fat or high carbohydrate diet to weaning rats. *J. Nutr.* 103: 690-696, 1973.

Harms, P.G.; Ojeda, S.R. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. *J. Appl. Physiol.* 36(3): 391-392, 1974.

Hausman, D.B.; DiGirolamo, M.; Bartness, T.; Hausman, G.J.; Martin, R.J. The biology of white adipose tissue proliferation. *Obesity reviews* 2: 239-254, 2001.

Hayashi, M.; Nagasaka, T. Suppression of norepinephrine-induced thermogenesis in brown adipose tissue by fasting. *Am. J. Physiol.*, 245: 582-E586, 1993.

Hietanen, E.; Greenwood, M.R. A comparison of lipoprotein lipase activity and adipocyte differentiation in growing male rats. *J. Lipid Res.* 18 (4): 480 – 490, 1977.

Hillgartner, F.B; Salati, L.M.; Goodridge, A.L. Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acids synthesis. *Physiol. Reviews* 75: 47-76, 1995.

Himms-Hagen, J. Nonshivering thermogenesis. *Brain Res. Bull.* 12: 151-160, 1984.

Himms-Hagen, J. Brown adipose tissue thermogenesis and obesity. *Prog. Lipid Res.* 28: 67-115, 1989.

Hopgood, M.F.; Ballard, F.J.; Reshef, L.; Hanson, R.W. Synthesis and degradation of phosphoenolpyruvate carboxylase in rat liver adipose tissue. *Biochem. J.* 134: 445-453, 1973.

Hollenberg, C.H. Effect of nutrition on activity and release of lipase from rat adipose tissue. *Am. J. Physiol.* 197: 667-670, 1959.

Holm C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem. Soc. Trans.* 31:1120–1124, 2003.

Holness, M.J.; Sugden, M.C. The impact of increased dietary lipid on the regulation of glucose uptake and oxidation by insulin in brown- and a range of white-adipose-tissue depots in vivo. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 23: 629-638, 1999.

Horton, R.W.; Medrum, B.S.; Bachelard, H.S. Enzymatic and cerebral metabolic effects of 2-deoxyglucose. *J. Neurochem.* 21: 507-520, 1973.

Im, S.S.; Kwon, S.K.; Kim, T.H.; Kim, H.I.; Ahn, Y.H. Regulation of glucose transporter type 4 isoform gene expression in muscle and adipocytes. *IUBMB Life* 59: 134-145, 2007.

Inokuma, K.; Okamatsu-Ogura, Y.; Omachi, A.; Matsushita, Y.; Kimura, K.; Yamashita, Y.; Saito M. Indispensable role of mitochondrial UCP1 for antiobesity effect of β 3-adrenergic stimulation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290: E1014-E1021, 2006.

Jaworski, K.; Sarkadi-Nagy, E.; Duncan, R.E.; Ahmadian, M.; Sul, H.S. Regulation of Triglyceride Metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 293: G1-G4, 2007.

Jezek, P.; Engstová, H.; Zacková, M.; Vercesi, A.E.; Costa, A.D.T.; Arruda, P.; Garlid, K.D. Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1365: 319-327, 1998.

Jones, D.D.; Ramsay, T.G.; Hausman, G.J.; Martin, R.J. Norepinephrine inhibits rat preadipocyte proliferation. *International Journal of Obesity*, 16: 349-354, 1992.

Kalhan, S. C.; Mahajan, S.; Burkett, E.; Reshef, L.; Hanson, R. W. Glyceroneogenesis and the source of glycerol for hepatic triacylglycerol synthesis in humans. *J. Biol. Chem.* 276: 12928-12931, 2001.

Kawashita, N.H.; Brito, M.N.; Brito, S.R.C.; Moura, M.A.F.; Festuccia, W.T.L.; Garófalo, M.A.R.; Machado, U.F.; Kettelhut, I.C.; Migliorini, R.H. Glucose uptake, glucose transporter GLUT4, and glycolytic enzymes in brown adipose tissue from rats adapted to a high-protein diet. *Metabolism* 11: 1501-1505, 2002^a.

Kawashita, N.H.; Festuccia, W.T.L.; Brito, M.N.; Moura, M.A.F.; Brito, S.R.C.; Garófalo, M.A.R.; Kettelhut, I.C.; Migliorini, R.H. Glycerokinase activity in brown adipose tissue: a sympathetic regulation? *Am. J. Physiol Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 282: R1185-R1190, 2002^b.

Kawashita, N.H.; Moura, M.A.F.; Brito, M.N.; Brito, S.M.R.C.; Garófalo, M.A.R.; Kettelhut, I.C.; Migliorini, R.H. Relative importance of sympathetic outflow and insulin in the reactivation of brown adipose tissue lipogenesis in rats adapted to a high-protein diet. *Metabolism* 3: 343-349, 2002^c.

Kersten S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO reports* 2: 282-286, 2001.

Kettelhut, I.C.; Foss, M.C.; Migliorini, R.H. Glucose homeostasis in a carnivorous animal (cat) and in rats fed a high-protein diet. *Am. J. Physiol.* 239: R437-R444, 1980.

Kettelhut, I.C.; Foss, M.C.; Migliorini, R.H. Lipolysis and the antilipolytic effect of insulin in adipocytes from rats adapted to a high-protein diet. *Metabolism* 34: 69-73, 1985.

Kipnis, D.M.; Cori, C.F. Studies of tissue permeability. The penetration and phosphorylation of 2-deoxyglucose in the rat diaphragm. *J.Biol.Chem.* 234: 171-177, 1959.

Kirsch, D.M.; Baumgarten, M.; Deufel, T.; Rinninger, F.; Kemmler, W.; Häring, H.U. Catecholamine-induced insulin resistance of glucose transport in isolated rat adipocytes. *Biochem. J.* 216: 737-745, 1983.

Kraemer, F.B.; Shen, W.J. Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *J. Lipid Res.* 43:1585–1594, 2002.

Krstulovic, A.M. Investigations of catecholamines metabolism using high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 35: 207-210, 1982.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.

Lafontan, M.; Berlan, M. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J. Lipid Res.* 34: 1057-1091, 1993.

Langin D. Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis. *C. R. Biol.* 329:598–607; discussion 653–55, 2006.

Liu, X.; Rossmeisl, M.; McClaine, J.; Kozak, L.P. Paradoxical resistance to diet-induced obesity in UCP-1 deficient mice. *J. Clin. Invest.* 111: 399-401, 2003.

Lladó, I.; Estrany, M.E.; Rodríguez, E.; Amengual, B.; Roca, R.; Palou, A. Effects of cafeteria diet feeding on β 3-adrenoceptor expression and lipolytic activity in white adipose tissue of male and female rats. *Int. J. Obes.* 24: 1396-1404, 2000.

Lladó, I.; Rodriguez-Cuenca, S.; Pujol, E.; Monjo, M.; Estranv, M.E.; Roca, P.; Palou, A. Gender effects on adrenergic receptor expression and lipolysis in white adipose tissue of rats. *Obes. Res.* 10: 296-305, 2002.

Londos, C.; Honnor, R.C.; Dhillon, G.S. cAMP-dependent protein kinase and lipolysis in rat adipocytes. III. Multiple modes of insulin regulation of lipolysis and regulation of insulin responses by adenylate cyclase regulators. *J. Biol. Chem.* 260:15139–15145, 1985.

Lowell, BB.; Susulic, V.S.; Hamann, A.; Lawitts, J.A.; Himms-Hagens, J.; Boyer, B.B.; Kozak, L.P.; Flier, J.S. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature* 366: 740 – 742, 1993.

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 139: 265-275, 1951.

Martins-Afféri, M.P.; Festuccia, W.T.L.; Navegantes, L.C.C.; Garófalo, M.A.R.; Botion, L.M.; Kettelhut, I.C.; Migliorini, R.H. Response to intra- and extracellular lipolytic agents and hormone-sensitive lipase translocation are impaired in adipocytes from rats adapted to high-protein, carbohydrate-free diet. *J. Nutr.* 134: 2919-2923, 2004.

Migliorini, R.H.; Garófalo, M.A.R.; Kettelhut, I.C. Increased sympathetic activity in rat white adipose tissue during prolonged fasting. *Am. J. Physiol.* 272: R656-R661, 1997.

Morrison, S.F. Central pathways controlling brown adipose tissue thermogenesis. *News Physiol. Sci.* 19: 67-74, 2004.

Moura, M.A.F.; Festuccia, W.T.L.; Kawashita, N.H.; Garófalo, M.A.R.; Brito, S.R.C.; Kettelhut, I.C.; Migliorini, R.H. Brown adipose tissue glyceroneogenesis is activated in rats exposed to cold. *Pflugers Arch. – Eur. J. Physiol.* 449: 463-469, 2005.

Moura, M.A.F.; Kawashita, N.H.; Brito, S.M.R.C.; Brito, M.N.; Kettelhut, I.C.; Migliorini, R.H. Effect of cold acclimation on brown adipose tissue fatty acid synthesis in rats adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet. *Metabolism* 12: 1493-1498, 2001.

Mulder, A.H.; Tack, C.J.; Olthaar, A.J.; Smits, P.; Sweep, F.C.G.J.; Bosch, R.R. Adrenergic receptor stimulation attenuates insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes by inhibiting GLUT4 translocation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289: E627-E633, 2005.

Nedergaard, J.; Bengtsson, T., Cannon, B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293: E444-E452, 2007.

Newsholme, E.A.; Robinson, J., Taylor, K. A radiochemical enzymatic activity assay for glycerol kinase and hexokinase. *Biochim Biophys Acta.* 132:338-46; 1967.

Nicholls, D.G. Hamster brown adipose tissue mitochondria: purine nucleotide control of the ionic conductance of the inner membrane, the nature of the nucleotide binding site. *Eur. J. Biochem.* 62: 223-228, 1976.

Nicholls, D.G.; Locke, R.M. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol. Rev.* 64: 1-64, 1984.

Nilsson-Ehle, P.; Schotz, M.C. A stable, radioactive substrate emulsion for assay of lipoprotein lipase. *J. Lipid. Res.* 17:536-41, 1976.

Olswang, Y.; Cohen, H.; Papo, O.; Cassuto, H.; Croniger, C.M.; Hakimi, P.; Tilghman, S.M.; Hanson, R.W.; Reshef, L. A mutation in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma binding site in the gene for the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase reduces adipose size and fat content in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 625-630, 2002.

Okazaki, H.; Osuga, J.; Tamura, Y.; Yahagi, N.; Tomita, S.; Shionoiri, F.; Iizuka, Y.; Ohashi, K.; Harada, K.; Kimura, S.; Gotoda, T.; Shimano, H.; Yamanda, N.; Ishibashi, S. Lipolysis in the absence of hormone-sensitive lipase: evidence for a common mechanism regulating distinct lipases. *Diabetes* 51:3368–3375, 2002.

Ong, J.M.; Saffari, B.; Simsolo, R.B.; Kern, P.A. Epinephrine inhibits lipoprotein lipase gene expression in rat adipocytes through multiple steps in posttranscriptional processing. *Mol. Endocrinol.* 6: 61-69, 1992.

Olsson, H.; Belfrage, P. The regulatory and basal phosphorylation sites of hormone sensitive lipase are dephosphorylated by protein phosphatase-1, 2A and 2C but not by protein phosphatase-2B. *Eur. J. Biochem.* 168:399–405, 1987.

Palou, A.; Picó, C.; Bonet, M.L.; Oliver, P. The uncoupling protein thermogenin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30: 7-11, 1998.

Persico, P.A.; Cerchio, G.M.; Jeffay, H. Glycerokinase in mammalian adipose tissue: stimulation by lipogenic substances. *Am. J. Physiol.* 228: 1868-1874, 1975.

Portillo, M.P.; Simón, E.; García-Calonge, M.A.; Del Barrio, A.S. Effect of high-fat diet on lipolysis in isolated adipocytes from visceral and subcutaneous WAT. *Eur. J. Nut.* 38: 177-182, 1999.

Radomski, M.W.; Orme T. Response of lipoprotein lipase in various tissues to cold exposure. *Am. J. Physiol.* 220: 1852-1856, 1971.

Ragolia, L.; Begum, N. Protein phosphatase-1 and insulin action. *Mol. Cell. Biochem.* 182:49–58, 1998.

Rauramma, R.; Kuusela, P., Hietanen E. Adipose, muscle and lung tissue lipoprotein lipase activities in young streptozotocin-treated rats. *Horm. Metab. Res.* 12: 591-595, 1980.

Reshef, L.; Hanson, R.W.; Ballard, F.J. A possible physiological role for glyceroneogenesis in rat adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 245: 5979-5984, 1970.

Rizkalla, S.W.; Mandenoff, A.; Betoulle, D.; Boillot, J.; Apfelbaum M. Decreased insulin binding to adipocytes precedes both hyperinsulinemia and decreased insulin binding to erythrocytes in cafeteria-fed rats. *Int. J. Obes.* **11**: 493-505, 1987.

Rodbell, M. Metabolism of isolated fatty cells: I-effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J.Biol.Chem.* 239: 735-380, 1964.

Rothwell, N.J.; Saville, M.E.; Stock, M.J. Effects of feeding a “cafeteria” diet on energy balance and diet-induced thermogenesis in four strains of rats. *J. Nutr.* **112**: 1515-1524, 1982^b.

Rothwell, N.J.; Stock, M.J. Effects of feeding a palatable 'cafeteria' diet on energy balance in young and adult lean (+/?) Zucker rats. *Br. J. Nutr.*, 47: 461-471, 1982^c.

Rothwell, N.J.; Stock, M.J. A role for BAT in diet-induced thermogenesis. *Nature* 281: 31-35, 1979.

Rothwell, N.J.; Stock, M.J.; Stribling D. Diet-Induced Thermogenesis. *Pharmac. Ther.* 17: 251-268, 1982^a.

Sandra, A.; Marshall, S.J. Effect of chronic isoproterenol exposure on insulin binding and insulin-stimulated hexose transport in isolated rat adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148: 1093-1097, 1987.

Schmid, H.; Kettelhut, I.C.; Migliorini, R.H. Reduced lipogenesis in rats fed a high protein, carbohydrate-free diet. *Metabolism*, 33: 219-223, 1984.

Schotz, M.C.; Garfinkel, A.S. The effect of puromycin and actinomycin on carbohydrate-induced lipase activity in rat adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta* 106: 202-205, 1965.

Skala, J.P.; Hahn, P.; Knight, B.L. Effect of insulin and prednisolone on cyclic nucleotides and phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in brown fat and liver of developing rats. *Biochim. Biophys. Acta* 631: 420-427, 1980.

Shimizu, Y.; Nikami, H.; Saito, M.J. Sympathetic activation of glucose utilization in brown adipose tissue in rats. *Biochem. (Tokyo)* 110: 688-692, 1991.

Shimizu, Y.; Satoh, S.; Yano, H.; Minokoshi, Y.; Cushman, S.W.; Shimazu, T. Effects of noradrenaline on the cell-surface glucosa transporters in cultured brown

adipocytes: novel mechanism for selective activation of GLUT-1 glucose transporters. *Biochem J.* 330:397-403, 1998.

Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olso, B.J.; Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85, 1985.

Sols, A.; Craine, R.K. The non-competitive inhibition of brain hexokinase by glucose-6-phosphate related and compounds. *J.Biol.Chem.* 210: 581-595, 1954.

Somogy, M. Determination of blood sugar. *J.Biol.Chem.* 160: 69-73, 1945.

Stralfors, P.; Honnor, R.C. Insulin-induced dephosphorylation of hormone-sensitive lipase. Correlation with lipolysis and cAMP-dependent protein kinase activity. *Eur.J. Biochem.* 182:379–385,1989.

Storlien, L.H.; James, D.E.; Burleigh, K.M.; Chisholm, D.J.; Kraegen, E.W. Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance decreased energy expenditure and obesity in rats. *Am. J. Physiol.* 251: E576-E583, 1986.

Su, C.L.; Sztalryd, C.; Contreras, J.A.; Holm, C.; Kimmel, A.R.; Londos, C. Mutational analysis of the hormone-sensitive lipase translocation reaction in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 278:43615–19, 2003.

Sztalryd, C.; Xu, G.; Dorward, H.; Tansey, J.T.; Contreras, J.A.; Kimmel, A.R.; Londos, C. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *J. Cell Biol.*161:1093–103, 2003.

Taubin, H.L.; Djahanguiri, B.; Landsberg, L. Noradrenaline concentration and turnover in different regions of the gastrointestinal tract of the rat: an approach to the evaluation of sympathetic activity in the gut. *GUT* 13: 790-795, 1972.

Thomas, S. A.; Palmiter, R. D. Thermoregulatory and metabolic phenotypes of mice lacking noradrenaline and adrenaline. *Nature* 387: 94-97, 1997.

Tontonoz, P.; Hu, E.; Devine, J.; Beale, E.G.; Spiegelman, B.M. PPAR γ 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol. Cell Biol.* 15: 351-357, 1995.

Tordjman, J.; Chauvet, G.; Quette, J.; Beale, E.G.; Forest, C.; Antonie, B. Thiazolidinediones block fatty acid release by inducing glyceroneogenesis in fat cell. *J.Biol.Chem.* 278: 18785-18790, 2003.

Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordin, J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 4350-4354, 1979.

Wick, A.; Drury, D.R.; Nakada, H.I.; Wolfe, J.B. Localization of primary metabolic block produced by 2-deoxy-glucose. *J.Biol.Chem.* 224: 963-969, 1957.

Windmueller, H.G.; Spaeth, A.E. Perfusion *in vivo* with tritium oxide to measure hepatic lipogenesis and lipid secretion. *J.Biol.Chem.* 224: 2891-2899, 1966.

Wing, D.R.; Salaman, M.R.; Robinson, D.S. Clearing-factor lipase in adipose tissue. Factors influencing the increase in enzyme activity produced on incubation of tissue from starved rats *in vitro*. *Biochem. J.* 99: 648-656, 1966.

Wing, D.R.; Robinson, D.S. Clearing-factor lipase in adipose tissue. A possible role of adenosine 3',5'-(cyclic)-monophosphate in the regulation of its activity. *Biochem. J.* 109: 841-849, 1968.

Young, J.B.; Saville, E.; Rothwell, N.J.; Stock, M.J.; Landsberg L. Effect of diet and cold exposure on norepinephrine turnover in brown adipose tissue of the rat. *J. Clin. Invest.* 69: 1061-1071, 1982.

Young, J.B.; Weiss, J.; Boufath, N. Effects of dietary monosaccharides on sympathetic nervous system activity in adipose tissues of male rats. *Diabetes* 53: 1271-1278, 2004.

Youngstron, T.G.; Bartness, T.J. White adipose tissue sympathetic nervous system denervation increase fat pad mass and fat cell number. *Am. J. Physiol.* 275: R1488-1493, 1998.

Zimmermann, R.; Strauss, J.G.; Haemmerle, G.; Schoiswohl, G.; Birner-Gruenberger, R.; Riederer, M.; Lass, A.; Neuberger, G.; Eisenhaber F.; Hermetter, A.; Zechner, R. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306: 1383–1386, 2004.

Zhang, J.; Hupfeld, C.J.; Taylor, S.S.; Olefsky, J.M.; Tsien, R.Y. Insulin disrupts beta adrenergic signaling to protein kinase A in adipocytes. *Nature* 437:569–573, 2005.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)